

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Física Teórica de la Materia Condensada

**DESARROLLO DE LA MICROSCOPIA
DE FUERZAS BIMODAL
PARA LA CUANTIFICACIÓN
DE PROPIEDADES NANOMECAÑICAS**

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor
en Ciencias Físicas por:

Elena Tomás Herruzo

Dirigida por el Prof. Ricardo García García
Tutelada por el Prof. Rubén Pérez Pérez

Instituto de Microelectrónica de Madrid
Centro Nacional de Investigaciones Científicas
Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Año 2011

Agradecimientos

Hace ya algún tiempo que llegué al Instituto de Microelectrónica recién salida de la Universidad. A pesar de haber cambiado una ciudad universitaria llena de árboles por una M-607 llena de atascos, el camino recorrido ha merecido la pena. A lo largo de estos años he aprendido muchas cosas, tanto científica como personalmente. Es hora de agradecer esto a todos aquellos que lo han hecho posible.

En primer lugar quiero agradecer a Ricardo García el haberme permitido trabajar con él y el haber dirigido mi trabajo científico. Desde el principio me enseñó la lectura entre líneas de los artículos de líquidos y la mayor parte de veces me ha proporcionado todo lo necesario e incluso más para trabajar correctamente.

En segundo lugar, quiero agradecer el apoyo que he tenido de la gente de mi grupo en todo momento. De los que estaban cuando llegué quiero agradecer a Shiva, que me transmitió toda su sabiduría del AFM en líquidos y algo de la del pollo tandoori. Paco, que me enseñó el método científico llevado a la práctica. Carlos, siempre didáctico. ZP, que predicaba con fórmulas para todo. Nuria, que me enseñó el stripper y los sellos de PDMS. Javi, que siempre me ayudó cuando se lo pedí. Y también a los que llegaron después: Jorge, Marco, Christian, Ryu, Horacio y Marta. Todos ellos transmiten una ilusión por la ciencia que no sé si es fácil de encontrar en otros grupos. Con ellos he tenido conversaciones muy gratificantes y me han transmitido multitud de ideas. En especial, muchas gracias Marta por las correcciones!

Quiero agradecer también a la gente de administración, a Mercedes y Toña, por las ayudas que me han dado en algunos momentos. Especial mención se merece Margarita por su ayuda prestada en el entorno laboral, donde siempre ha operado de forma rápida y efectiva, y también por los cafés que nos hemos tomado de vez en cuando.

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que han hecho y hacen del IMM un sitio entrañable. Aunque algunos de ellos ya no están en el Instituto. Gracias a Nuria por ser una de las mejores personas que conozco y por haberme hecho sentir cómoda desde que llegué, a la Mandu por los cafés del Línea Directa, por ser una magnífica aprendiz de yogui, por estar presente incluso ahora que está lejos. A la mami Merce por hacerme reír y alegrarme la mayor parte de los días y por estar ahí cuando se la necesita. A Carlos por haberme enseñado los mejores bares de Madrid, por las conversaciones siempre interesantes y variadas. A Juan, por aportarme toda

su calidad futbolística los miércoles-noche, por haberme enseñado el Munchkin! A todos ellos por el Cinefórum y el Antolins, junto a vosotros he pasado unos ratos inolvidables durante estos años y estoy seguro de que los seguiré pasando.

Me gustaría también dar las gracias, a Paco y Javi Martínez, qué pena no tenerles ya, el IMM será mucho más aburrido ahora sin helicópteros, puzzles e ideas locas. A ZP, por sus consejos y su forma de escucharte con atención. A MacDani, por ser tan atento y simpático siempre. Gracias también a Elías por la conversación de primera hora de la mañana, a Edu por sus visitas diarias al despacho y por ser el único que usa nuestra pizarra, a Marcos por las tartas de Santiago y el hilo musical que puso al despacho.

Mención especial tiene la gente que hace que el IMM sea un sitio especial donde trabajar: Paco, Elías y Piñera por haber organizado las pachangas que si no nunca se hubieran jugado. Elías y Javi o el que sea, por haber organizado periódicamente las cenas por Madrid donde tanto nos hemos reído, el organizador del amigo invisible, por habernos estresado cada año la navidad con tanto regalo manual...

Gracias a Patricia y Alvarito, lo he pasado muy muy bien con vosotras. Y a otros que ya estaban o llegaron despues que yo: Mariana, Sheila, Olga, Diana, Étor, PG, Cris, Manuel, Cristina, gracias a todos por ser tan simpáticos, de verdad.

De la gente que no es del IMM quiero agradecer de forma especial a Ioana y a sus ganas de vivir, a su optimismo, a lo a gusto que uno se siente a su lado. A Adri porque al final siempre aparece cuando le decimos a pesar de sus múltiple compromisos. A Elena, Paz, Berta, Ainhoa, Laura y Paula, mis amigas de toda la vida, que a pesar de su complicada agenda siempre tienen un hueco y parece que no ha pasado el tiempo.

En cuanto a mi familia, quiero agradecerle el haberme apoyado en todas las decisiones que he tomado hasta ahora. A mis padres, el haberme enseñado el valor del esfuerzo y del trabajo diario. Gracias también por el cariño y apoyo que dan cada día, no se puede pedir más a unos padres. A mi hermano David por ser la vela que me mantiene activa: sin el no hubiera formado un grupo de música ;) aprendido tango, conocido pelis y música (qué lastima que la historia y la economía se hayan quedado atrás). A mi hermana Belén por haber estado ahí cuando la he necesitado, desde muy pequeña hasta muy mayor, y por ayudarme a intentar ser mejor. Y a ella y a Willy por haber tenido los dos hijos más bonitos del mundo: el coche rojo Lucas y AArooon, no sé por qué le pondrían un nombre tan difícil. Sin todos ellos no sería la persona que soy ahora. También a mis abuelos, a mis tíos y a mis primos, por todos los buenos días que hemos pasamos juntos y que pasaremos.

Quiero terminar dándote las gracias, Joaquín, por existir y por estar conmigo cada día y los que quedan por venir. Mi vida sin tí no hubiera sido nunca tan feliz como lo es ahora a tu lado. Gracias por haber venido a trabajar a Tres Cantos, por hacerme reir todos los días, por tus recomendaciones, por tus consejos, por haber reconocido que BarÇa=Messi (o no lo reconociste?), por las ayudas con la tesis y por todos los días que nos hemos ido a la biblioteca últimamente. Contigo al lado sí que ha sido llevadero escribir la tesis!!

Abreviaturas

STM	Scanning Tunneling Microscope. Microscopio de Efecto Túnel.
AFM	Atomic Force Microscope. Microscopio de Fuerza Atómica.
AM-AFM	Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy. Microscopía de Fuerzas Atómica modulada en amplitud.
FM-AFM	Frequency Modulation Atomic Force Microscopy. Microscopía de Fuerzas Atómica modulada en frecuencia.
SPAM	Scanning Probe Accelerometre Microscopy. Microscopía de fuerzas de aceleración .
3D-SFM	Three Dimensional Scanning Force Microscopy. Microscopía de fuerzas tridimensional.
PFM	Pulsed Force Mode Método de fuerza pulsada.
SNR	Signal-to-Noise Ratio. Relación señal/ruido.
InvOLS	Inverse Optical Lever Sensitivity. Inversa de la Sensibilidad Óptica del fotodiodo .
bR	Bacteriorhodopsin. Bacteriorodopsina.
PBS	Phosphate Buffered Saline. Tampón fosfato salino.
UHV	Ultra-High Vacuum. Ultra-alto vacío.
DFT	Density Functional Theory. Teoría del funcional de densidad.
LDA	Local Density Approximation. Teoría de densidad local.
LTI system	Linear-time invariant system. Sistema linal e invariante en el tiempo.
OMCTS	Octametilcyclotetrasiloxane Octametilcyclotetrasiloxano.

Resumen

Esta tesis gira en torno a dos elementos principales. El primero de ellos es la microscopía de fuerzas bimodal, un modo de microscopía basado en la excitación simultánea de los dos primeros modos de oscilación de la micropalanca, que proporciona un aumento de resolución bajo la aplicación de fuerzas pequeñas. El segundo, la compleja dinámica de una micropalanca oscilando en líquidos y sus implicaciones en lo que a microscopía de fuerzas en líquidos se refiere.

El primer objetivo de esta tesis es implementar la microscopía bimodal en líquidos con el consecuente aumento de resolución lateral que promete, y proporcionar además información cuantitativa de las muestras medidas. En particular, se intentará relacionar los canales bimodales con la fuerza de interacción, de tal forma que se pueda adquirir una imagen simultánea de la topografía y el módulo de Young efectivo de la muestra.

El segundo objetivo es investigar cuestiones fundamentales de la oscilación de la micropalanca en líquidos, como su dependencia en el método de excitación, el decrecimiento asimétrico que la oscilación de la micropalanca en líquidos sufre al acercarse a la muestra, o los elementos más relevantes en la generación de los armónicos superiores observados experimentalmente.

Ambos objetivos se intentan desarrollar y analizar con claridad a lo largo de esta tesis, la cual se estructura en 6 capítulos:

- El primer capítulo presenta una introducción a la microscopía de fuerzas enfocada al lector no familiarizado con el tema. Se describen de forma básica los elementos constituyentes, los diferentes modos de operación, la metodología y finalmente, los avances científicos más relevantes de la última época que tienen como base la microscopía de fuerzas.
- El segundo capítulo contiene una introducción a la dinámica de la micropalanca del microscopio de fuerzas oscilando en líquidos. Consta de una pequeña introducción a la dinámica de fluidos y en particular a la de una barra oscilante y de una descripción de los métodos teóricos utilizados para enfocar el problema. Finaliza presentando la dependencia en la dinámica de la micropalanca en el medio de excitación utilizado y en el medio en el que está sumergida.
- El tercer capítulo presenta la implementación de la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos. Además de reproducir los resultados experimentales de

la microscopía de fuerzas bimodal en aire, presenta resultados experimentales de biomoléculas en agua y estudia la optimización del contraste mediante la variación de diversos parámetros.

- El cuarto capítulo consiste en la formulación de un método de reconstrucción del módulo de Young efectivo de una muestra utilizando la microscopía de fuerzas bimodal. En la primera parte del capítulo se describe el modelo teórico y las aproximaciones en las que se basa. En la segunda parte, se presenta la implementación experimental del método sobre una muestra de anticuerpos pentaméricos IgM sobre mica.
- El quinto capítulo profundiza en las causas y consecuencias de la generación de armónicos superiores de la frecuencia de oscilación de la micropalanca. En la primera parte del capítulo se presentan una serie de resultados en relación a la generación de armónicos y su dependencia en el medio y en los parámetros de la medida, así como algunas aproximaciones muy útiles a importantes parámetros relacionados con la fuerza de interacción. En la segunda parte del capítulo se utilizan estas aproximaciones para proponer un método de reconstrucción del módulo de Young efectivo de una muestra a partir de cantidades sencillas de medir desde el punto de vista experimental.
- El sexto capítulo presenta la combinación de la microscopía de fuerzas bimodal y de la microscopía de fuerzas tridimensional y su aplicación a la medida de las capas de hidratación entre la muestra y la punta. Se detallan los resultados obtenidos sobre una muestra plana a nivel atómico como la mica y sobre una muestra irregular, rugosa y sujeta a fluctuaciones térmicas como la red bidimensional de GroEL.

Palabras clave

Microscopía de fuerzas, Microscopía de fuerzas bimodal, Microscopía de fuerzas multifrecuencia, AFM, AFM en líquidos, módulo de Young efectivo, armónicos superiores, capas de solvatación.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Invención del Microscopio de Fuerza Atómica	1
1.2. Modelo físico en el que se basa un microscopio de fuerza atómica . . .	2
1.3. Condiciones necesarias para obtener resolución atómica	3
1.3.1. Modo estático	5
1.3.2. Modos dinámicos	6
1.3.3. Reto científico	9
1.4. Modo de operación de un AFM	10
1.4.1. Preparación de las muestras	11
1.4.2. Colocación de la punta, alineación del láser	12
1.4.3. Adquisición de imágenes	13
1.4.4. Calibración de los parámetros	14
1.4.5. Procesamiento de las imágenes	15
1.5. Trabajos destacados	16
1.5.1. Microscopía de fuerzas a velocidad de vídeo	16
1.5.2. Primera imagen de los átomos de una molécula	18
1.5.3. Manipulación de átomos sobre una superficie no conductora .	19
1.5.4. Visualización de cambios estructurales en redes de proteínas .	19
1.5.5. Adquisición simultánea de la flexibilidad de proteínas y de su topografía	21
1.6. Enfoque del trabajo	22
2. Dinámica de la micropalanca en líquidos	25
2.1. Introducción: la ecuación de Navier-Stokes	25
2.1.1. Conceptos básicos de dinámica de fluidos.	26
2.1.2. Fuerzas hidrodinámicas	29
2.2. Acoplo hidrodinámico a la oscilación de la micropalanca: interacción sólido-líquido	31
2.2.1. Modelos	31
2.2.2. Método semi-analítico de Sader	34
2.2.3. Comportamiento no simétrico de la fuerza hidrodinámica . . .	38
2.3. Excitación de la micropalanca	40
2.3.1. Importancia del pico de resonancia	41

2.3.2.	Excitación magnética y excitación acústica pura.	41
2.3.2.1.	Modelo unidimensional	43
2.3.2.2.	Modelo bidimensional	47
2.3.3.	Simulaciones numéricas	50
2.4.	Conclusiones	52
3.	La microscopía de fuerzas bimodal	55
3.1.	Introducción	55
3.1.1.	La microscopía de fuerzas multifrecuencia	55
3.1.2.	La microscopía de fuerzas bimodal	56
3.1.3.	Objetivos	57
3.2.	Resultados experimentales	58
3.2.1.	Implementación de la microscopía de fuerzas bimodal	58
3.2.2.	Experimentos en condiciones ambiente	58
3.2.3.	Experimentos en líquidos	63
3.3.	Interpretación de los resultados experimentales	71
3.3.1.	Optimización de los parámetros en aire	72
3.3.2.	Dependencia del efecto bimodal con el cociente de amplitudes.	74
3.3.3.	Dependencia del efecto bimodal con el factor de calidad.	76
3.3.4.	Optimización de los parámetros en líquido	76
3.4.	Conclusiones	78
4.	Implementación de la microscopía de fuerzas bimodal a la medida del módulo de Young efectivo	81
4.1.	Introducción	81
4.1.1.	Fuerzas de contacto	81
4.1.2.	Revisión de la literatura	83
4.1.3.	Objetivos	87
4.2.	Experimentos bimodales en modulación en frecuencia	88
4.2.1.	Montaje experimental	88
4.2.2.	Resultados experimentales	90
4.3.	Modelo teórico para la reconstrucción del módulo de Young efectivo	90
4.3.1.	Fórmulas del virial y de la energía disipada en FM-AFM.	90
4.3.2.	Dependencia de la aproximación con el cociente de amplitudes	94
4.3.3.	Dependencia del factor de corrección en el cociente de amplitudes	94
4.3.4.	Dependencia del factor de corrección con la ley de fuerzas	96
4.3.5.	Fórmulas del virial y de la energía disipada en AM-AFM	97
4.4.	Reconstrucción del módulo de Young efectivo a partir de una imagen de AFM	99
4.4.1.	Obtención del factor de corrección experimental	99
4.4.2.	Reconstrucción del módulo de Young efectivo de la imagen	101
4.5.	Conclusiones	102

5. Generación de armónicos superiores en medios de factor de calidad bajo	105
5.1. Introducción	105
5.1.1. Fuerzas lineales y fuerzas no lineales	105
5.1.2. Revisión de la literatura.	107
5.1.3. Objetivos	108
5.2. Simulaciones numéricas	110
5.2.1. Distorsión armónica de la señal	111
5.2.2. Decrecimiento asimétrico de la señal	112
5.2.3. Dependencia de t_c y F_{peak} en los parámetros de la oscilación	113
5.2.4. Dependencia de la sensibilidad de los armónicos en el factor de calidad	115
5.2.5. Curva de resonancia	115
5.2.6. Deflexión y dependencia de la sensibilidad de la deflexión en el factor de calidad	117
5.2.7. Resumen	117
5.3. Aproximación analítica	118
5.3.1. Teoría de perturbaciones	119
5.3.2. Método basado en cantidades promedio	121
5.4. Aproximación semi-analítica	122
5.4.1. Atenuación de los armónicos	126
5.5. Método para reconstruir el módulo de Young efectivo E^* a partir de A_{sp} , z_0 , A_2 y A_3	127
5.5.1. Validez de la aproximación como una fuerza de impacto repulsiva.	127
5.5.2. Aproximación fenomenológica alternativa a $F_{ts}(t)$	127
5.5.3. Reconstrucción de t_c y F_{peak}	130
5.5.4. Reconstrucción de z_c y E^*	131
5.5.5. Validez del método de reconstrucción de E^* en agua y aire	132
5.6. Resultados experimentales.	133
5.6.1. Adquisición de imágenes en ϕ , A_2 y x_0 en agua y aire	133
5.7. Conclusiones	135
6. Medida de las capas de solvatación sobre mica y redes de proteínas	139
6.1. Introducción	139
6.1.1. Fuerzas de solvatación	139
6.1.2. Revisión de la literatura	140
6.1.3. Objetivos	144
6.2. Microscopía de fuerzas bimodal en modo tridimensional: montaje experimental	145
6.3. Requisitos del montaje experimental para la medida de capas de hidratación.	147
6.4. Resultados experimentales sobre mica	149

6.4.1.	Comportamiento al variar la amplitud libre.	150
6.4.2.	Comportamiento al variar $\langle A_1 \rangle$	150
6.4.3.	Comparación entre los canales de amplitud y fase	152
6.4.4.	Espaciamiento de las capas	152
6.4.5.	Dependencia en la composición de la punta	154
6.5.	Aplicación de la microscopía de fuerzas bimodal	154
6.5.1.	Comparación de la resolución lateral en los canales de A_1 y ϕ_2	155
6.5.2.	Comportamiento al disminuir el cociente de amplitudes A_{01}/A_{02}	155
6.5.3.	Comportamiento de las capas de hidratación al incrementar A_{02}	157
6.5.4.	Comportamiento viscoelástico	161
6.5.5.	Dependencia de las capas de hidratación con la forma de la punta	161
6.6.	Resultados experimentales sobre GroEL	162
6.7.	Conclusiones	164
Conclusiones generales		167
Lista de publicaciones		169
Bibliografía		179

Capítulo 1

Introducción

1.1. Invención del Microscopio de Fuerza Atómica

El microscopio de fuerza atómica (Atomic Force Microscope - AFM) fue inventado por Gerd Binnig, Christoph Gerber y Calvin Quate en el año 1986 [1] partiendo de las bases del microscopio de efecto túnel (Scanning Tunnel Microscope - STM). El microscopio de efecto túnel había sido inventado cuatro años antes, en el año 1981 por Gerd Binnig y Heinrich Rohrer [2], quienes recibirían luego el Premio Nobel de Física en el año 1986. Las palabras de ámbos cuando recibieron el premio resumen los retos y posibilidades que el STM prometía.

“...donde se originó el STM: la realización de un experimento local, en una posición preseleccionada y a una escala espacial de dimensiones atómicas. Además de la toma de imágenes, abre nuevas posibilidades para estudiar la muestra, bien de forma no destructiva, o para modificarla localmente: altos campos eléctricos, extremas densidades de corriente, deformaciones locales, la medida de fuerzas tan pequeñas como aquéllas de los átomos individuales por mencionar sólo unas pocas, y de forma última manipular átomos y modificar moléculas individuales, usar el STM como una máquina de Feynman. Este área todavía no ha alcanzado la adolescencia...”

Este año se cumplen 30 años desde la invención del STM y 25 años desde la del AFM. Utilizando las palabras de Binnig y Rohrer, se puede considerar que estos campos ya han pasado a su madurez. Muchos de los retos que entonces parecían inimaginables se han obtenido. El conocimiento que a día de hoy se tiene de la materia a escala atómica ha sido conseguido en gran medida gracias a la utilización de estos tipos de microscopía.

1.2. Modelo físico en el que se basa un microscopio de fuerza atómica

Al hablar de un microscopio es fundamental entender el principio físico en el que se basa. Mientras que el microscopio óptico y el electrónico obtienen una medida directa de la muestra a través de un haz incidente de luz o de electrones, existen otro tipo de microscopios que miden la muestra de forma indirecta y son conocidos como microscopios de sonda local. Estos microscopios registran cambios en las propiedades de la **sonda** mediante un determinado **sistema de detección** a medida que escanea la muestra deseada.

El predecesor del microscopio de fuerza atómica (AFM) es el microscopio de efecto túnel (STM), que se basa en el concepto cuántico de corriente túnel: la sonda utilizada es una punta conductora (tungsteno, aleación de platino-iridio, oro...). Cuando ésta se acerca a la superficie conductora, es posible que parte de los electrones atraviesen de una a otra creando así una corriente que depende de la distancia entre la punta y la muestra, del voltaje aplicado, y de la densidad local de estados de la muestra. Esta corriente se mide de forma directa y es posible relacionar cambios en la corriente con cambios en la densidad local de estados de la muestra. Además, como la corriente túnel crece exponencialmente de forma monótona a medida que decrece la distancia entre la punta y la muestra, también es posible relacionar cambios en la corriente con cambios en la topografía de la muestra. La dependencia exponencial y monótona de la corriente túnel con la distancia hace posible que la microscopía de efecto túnel produzca de forma regular imágenes con periodicidad atómica real [3]. La mayor limitación de este tipo de microscopía es que su aplicación se reduce a muestras conductoras.

En la microscopía de fuerzas atómica, sin embargo, lo que se miden son fuerzas. El sensor utilizado para medir la muestra es una micropalanca de tamaño microscópico (su longitud está entre 100-300 μm). La necesidad de una micropalanca de un tamaño que apenas se puede ver con el ojo humano nace de la magnitud de las fuerzas que se desean medir. Cuando la micropalanca no está en movimiento, la micropalanca responde a un cambio en la fuerza de interacción con un cambio en la deflexión de acuerdo a la ley de Hooke $F_{ts} = -kz_0$. Para las micropalancas utilizadas las fuerzas mínimas F_{ts} que se pueden medir dependen del rango de la deflexión mínima z_0 que pueda ser detectada, y normalmente están entre los pN y los nN (la fuerza necesaria para romper un enlace covalente es del orden de los nN). Si agrandásemos la micropalanca hasta hacerla de dimensiones del orden de metros aumentando su volumen seis órdenes de magnitud, su constante de fuerza sería también seis órdenes de magnitud mayor y las fuerzas que se podrían medir suponiendo la misma deflexión detectada estarían en el orden de los mN (aproximadamente el peso de un mosquito). Otro término importante es el concepto de resolución lateral, relacionado con la menor diferencia entre dos objetos que es posible medir. El tamaño de la sonda que se utiliza fija un límite inferior para la escala a la que somos sensibles. En este caso, la punta corresponde a la partícula de sondeo, y no puede

ser mayor que la característica física que se quiere medir. Por ejemplo, nunca podremos ver la rugosidad a escala microscópica de nuestra mesa de estudio si pasamos por encima nuestro dedo. Traducido a escala nanométrica esto equivale a decir que nunca se podrán resolver dos átomos separados entre sí con algo cuyo diámetro es mayor que el de un átomo.

La microscopía de fuerzas consiste en escanear una muestra mientras se registran los cambios en alguna de las propiedades de la sonda local, esto es, de la micropalanca. Estos cambios son muy pequeños (entre 0.1-1 nm en la escala vertical), por lo que es necesaria la instalación de un sistema de detección que sea capaz de detectarlos. El sistema de detección más extendido es el OBD (Optical Beam Deflection) [4, 5], consistente en un haz láser que incide y se refleja sobre la parte trasera de la micropalanca (que normalmente está recubierta de un metal) para luego ser recogido por un fotodetector que está alejado a una distancia del orden de centímetros. Esto permite que los cambios en la pendiente de la micropalanca se vean amplificados al llegar al fotodetector. El fotodetector transforma el haz incidente en una señal eléctrica que la electrónica del microscopio procesa. El ruido electrónico del sistema de detección es una magnitud a minimizar. En el caso del OBD depende, entre otras cosas, de la distancia entre la micropalanca y el fotodetector, del diámetro del haz láser, del ruido shot y de Johnson-Nyquist del fotodetector... [6]. Para minimizar el ruido electrónico y ser capaces de medir con amplitudes muy pequeñas es necesario modificar el sistema de detección. Algunos grupos han mejorado el OBD mejorando cada uno de los componentes relacionados con el ruido electrónico [6, 7, 8], mientras que otros han optado por utilizar técnicas alternativas como por ejemplo técnicas interferométricas [9, 10, 11].

1.3. Condiciones necesarias para obtener resolución atómica

La posibilidad de tomar imágenes con resolución atómica real se reduce a que el tamaño de la sonda que se utilice sea comparable a lo que se quiera medir. Si se quieren medir diferencias entre dos átomos, se ha de ser capaz de medir la fuerza de interacción entre un átomo de la punta y un átomo de la muestra [12]. Es preciso distinguir la resolución atómica real de la resolución de red. Mientras que en una imagen en la que se observa resolución de red se diferencia el patrón que siguen los átomos que forman la red cristalina, en una imagen con resolución atómica real se ha de ser capaz de observar también defectos de la red cristalina. A continuación presento los factores necesarios para obtener resolución atómica o molecular real:

- Contrarrestar las interacciones atractivas de largo alcance, que resultan en una fuerza que es la suma de la contribución de varios átomos. Para esto se necesita reducir la amplitud libre hasta el punto que la relación señal/ruido (SNR - signal-to-noise ratio) permita [13].

- Evitar el contacto y una más que probable deformación apreciable de la punta y de la muestra [14].
- Medir con puntas de radio muy pequeño e intentar que su extremo sea de un sólo átomo o una sola molécula y que no se dañen durante la medida [15, 16].
- Medir en un rango donde las fuerzas varíen de forma rápida con la distancia [17].
- Tener un control robusto de la distancia vertical para evitar inestabilidades y que la punta contacte con la superficie [6, 16].
- Minimizar el ruido térmico, bien aumentando la constante de fuerzas [6] o aumentando la velocidad de barrido [18].

Técnicamente, sería deseable mantener una punta terminada en un único átomo a una distancia de menos de 1 nm y aplicando una fuerza de menos de 1 nN [12].

El factor de calidad de la micropalanca Q es un factor fundamental para operar a fuerzas de interacción pequeñas como las necesarias para obtener resolución atómica. Depende del medio en el que la micropalanca esté inmersa, ya que está relacionado con las pérdidas por disipación. El ultra-alto vacío (UHV) es un vacío caracterizado por presiones menores que 10^{-7} Pa. Para que el AFM opere en UHV es necesario introducir el microscopio en una cámara de vacío con todas las dificultades tanto económicas como prácticas que esto conlleva. En UHV la disipación es muy baja, por lo que el factor de calidad Q de la micropalanca está entre 30000 – 40000. Otra de las ventajas de operar en UHV es que los experimentos se pueden realizar sobre muestras totalmente limpias y cristalinas a escala atómica. El AFM puede operar también en condiciones ambiente (aire), donde Q está entre 100 – 400 y en líquidos, donde el aumento de densidad y viscosidad del medio provoca una drástica caída del factor de calidad hasta valores de 1 – 10.

El factor de calidad de la micropalanca no es lo único que depende del medio en el que ésta esté inmersa. También las fuerzas intermoleculares y de superficies que están presentes, y con ello su variación con la distancia. Las fuerzas que el AFM mide no decaen de forma exponencial con la distancia como ocurría con la corriente túnel que el STM medía. Además, tampoco aumentan monótonamente con la distancia, y es preciso analizar cada caso en particular. Por ejemplo, las fuerzas atractivas debidas a dipolos instantáneos presentes en UHV y en aire, estarían apantalladas por las moléculas de un medio líquido polar cuando se introduce la micropalanca en agua [19]. Otro ejemplo ilustrativo es el de las fuerzas capilares, que dependen del medio en el que la micropalanca esté inmersa, la humedad relativa del medio y de la hidrofobicidad/hidrofobicidad tanto de la muestra como de la punta [20].

El microscopio de fuerzas puede ser operado en diversos modos, tanto estáticos como dinámicos, si bien la característica común es el escaneo de la muestra a medida que un sistema de realimentación mantiene una magnitud constante. Estos modos

están directamente relacionados con la fuerza que es posible aplicar y con la robustez del sistema. Por ello, a pesar de los numerosos trabajos realizados hasta la fecha, aún existe controversia acerca de cuál es el factor más decisivo en la obtención de imágenes con resolución atómica real. A continuación presentaré un pequeño resumen de los modos de operación más comunes.

1.3.1. Modo estático

En el modo estático o de contacto, la punta de la micropalanca está en contacto con la muestra mientras la escanea. Se puede mantener constante bien la distancia media o bien la deflexión de la micropalanca, dependiendo de lo plana que sea la topografía de la muestra a medir. En el modo de deflexión constante, se acerca la punta a la muestra de tal forma que se mantenga la deflexión igual al valor de la deflexión de trabajo. Cuando la micropalanca comienza a escanear y atraviesa una zona con distinta topografía o composición, el cambio en la fuerza de interacción provoca un cambio en la deflexión de la micropalanca. El sistema de realimentación desplaza la muestra en la dirección vertical, de tal forma que la distancia punta-muestra z_c varía para que la deflexión sea constante e igual al valor de una cierta deflexión de trabajo. El modo estático tiene diversos inconvenientes. Por una parte tiene una gran deriva y ruido electrónico. Por otra, el límite de la resolución lo fija el radio de contacto, y normalmente en modo contacto éste es de varios nanómetros. Existen algunas discrepancias experimentales sobre si el modo contacto puede proporcionar resolución atómica real. Se han obtenido imágenes de la periodicidad de la red sobre materiales como grafito y nitruro de boro, pero no se han observado defectos individuales. El hecho de que estas imágenes persistan con altas fuerzas de contacto (100 nN) donde el radio de contacto es grande (100 Å) y el número de átomos involucrado también, indica que existe deformación en ambas superficies [21]. Los cálculos teóricos de Pérez y colaboradores [14] evidencian la imposibilidad de ver la superficie con resolución atómica real, debido a que la alta fuerza puede degradar la punta y aplanarla. La resolución de red podría ser entonces atribuida a interacciones debidas a la fuerza de fricción promediada sobre un gran área de contacto. Como excepción a la regla, existen dos trabajos con resolución atómica real. Schimmel y colaboradores obtuvieron imágenes con resolución atómica real en aire [22] utilizando micropalancas de nitruro de silicio de $k = 0.37$ N/m y fuerzas aplicadas del orden de 1 nN sobre una muestra de 2H-NbSe₂(0001) (véase figura 1.1a), si bien estos resultados no han sido reproducidos con facilidad. Onhesorge y Binnig también obtuvieron imágenes con verdadera resolución atómica en agua [23] utilizando micropalancas de silicio de constante de fuerzas $k = 0.2$ N/m y radio nominal 10 nm, y fuerzas aplicadas de entre 10 y 60 pN. Por otro lado, el grupo de Andreas Engel en la universidad de Basilea es ampliamente conocido por sus imágenes de resolución sub-nanométrica sobre biomoléculas (véase figura 1.1c), que sólo son posibles de obtener incrementando la relación señal/ruido a base de promediar

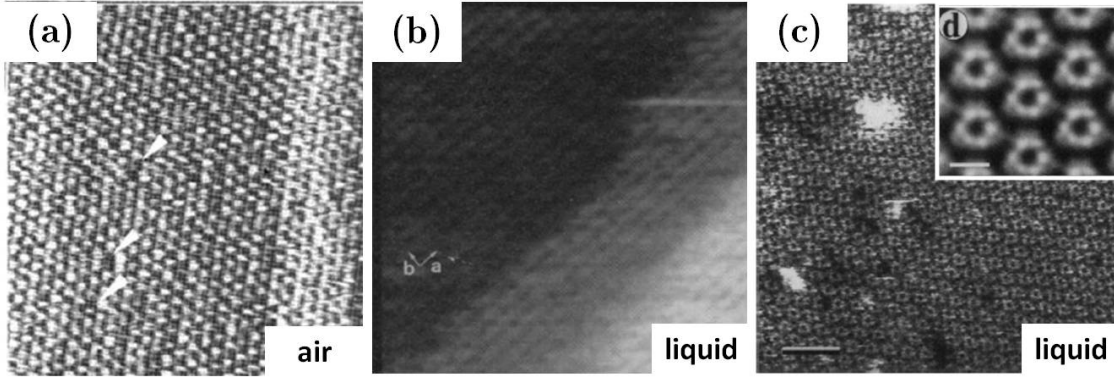


Figura 1.1: Microscopía de fuerzas en modo contacto. (a) Imagen de topografía sobre una muestra de $2\text{H-NbSe}_2(0001)$ tal y como aparece en [22], (b) imagen de topografía sobre una muestra de calcita con resolución atómica en líquidos tal y como aparecen en [23] y (c) imágenes de topografía sobre una muestra de membrana púrpura tal y como aparece en [24].

varias imágenes tomadas sobre la misma área a través de un post-procesamiento de las imágenes.

1.3.2. Modos dinámicos

AM-AFM: Microscopía de fuerzas modulada en amplitud

En la microscopía de fuerzas en modulación de amplitud (Amplitude Modulation Atomic Force Microscopy - AM-AFM), la micropalanca siempre se excita a una frecuencia fija. Esta frecuencia suele coincidir con la de resonancia para así operar en el rango de valores que más varía con la fuerza de interacción. En AM-AFM la micropalanca responde a esta señal de excitación oscilando a la misma frecuencia. Esta oscilación está caracterizada por una amplitud y un desfase respecto a la señal de excitación. Cuando la micropalanca está lo suficientemente lejos de la muestra como para que la fuerza de interacción sea nula, la amplitud en resonancia es igual a la amplitud libre A_0 y el desfase en resonancia de la oscilación con respecto a la señal de excitación es de 90° (véase la figura 1.2a). Para estar en disposición de comenzar la toma de imágenes, se ha de acercar la micropalanca a la muestra de tal forma que ésta oscile a una determinada distancia punta-muestra z_c donde su amplitud se ha reducido a una determinada amplitud de trabajo A_{sp} . Cuando la micropalanca comienza a escanear y atraviesa una zona donde existe una diferencia en altura, o una diferencia en las propiedades físicas que la describen, cambia su oscilación, de tal forma que su amplitud disminuye (A') y su fase cambia (ϕ'). El escáner en z desplazará verticalmente la muestra para variar z_c de tal forma que la amplitud se mantenga igual a la amplitud de trabajo. Se obtendrá entonces una imagen de topografía a partir del registro del movimiento del escáner, e imágenes simultáneas

en el canal auxiliar de fase ϕ . La respuesta de la micropalanca a un cambio en la fuerza de interacción no es instantánea. Consta de un transitorio que depende de ω y Q y de una señal estacionaria [25]. Debido a la dependencia del transitorio en Q ($\tau = \frac{2Q}{\omega_0}$), históricamente, se ha utilizado la técnica AM-AFM únicamente en aire y líquidos, ya que en ultra-alto vacío el transitorio es demasiado largo y el método no resulta práctico.

La electrónica que hace posible AM-AFM consta de lo que se denominan lock-in amplifiers. Un lock-in amplifier es básicamente un dispositivo electrónico que compara la señal a procesar con una señal de referencia para obtener la amplitud y la fase de la señal procesada.

La técnica AM-AFM no produce imágenes regulares de resolución atómica. Existen dudas acerca de si esto es inherente al modo de operación, como lo era en contacto. Sin embargo, existen trabajos que avalan la validez de la técnica para obtener imágenes de alta resolución. Magonov obtuvo resolución molecular creciendo sobre las puntas de la micropalanca picos afilados de carbono, de tal forma que sus radios fueran de alrededor de 1 nm [15]. En la figura 1.2b se muestra una imagen de un cristal de polidiacetileno (un polímero conductor) en aire utilizando AM-AFM con una micropalanca de 5 N/m, una amplitud libre de 4 nm y una amplitud de trabajo alta. La resolución lateral es de 0.36 nm, y se pueden observar defectos moleculares en el plano.

Recientemente, Stellacci y colaboradores obtuvieron imágenes con resolución atómica sobre varios sustratos en líquidos [17]. Eligiendo un rango de amplitudes libres y de trabajo tales que la punta no oscilara en un régimen de contacto intermitente con el sólido (y en lugar de ello interactuara con el líquido interfacial existente entre la punta y la muestra), fueron capaces de obtener, por ejemplo, imágenes con resolución atómica de la mica (véase figura 1.2c) con puntas cuyo radio nominal es de 15 nm. La obtención de imágenes con resolución atómica con este tipo de puntas ha de ser debida a microasperidades de la punta, por lo que esta resolución sería muy dependiente del sentido de barrido.

FM-AFM: Microscopía de fuerzas modulada en frecuencia

En la microscopía de fuerzas en modulación de frecuencia (Frequency Modulation Atomic Force Microscopy - FM-AFM), la micropalanca siempre se excita en resonancia. La oscilación de una micropalanca autorealimentada está caracterizada por una amplitud y una frecuencia determinadas. Cuando la micropalanca está lo suficientemente lejos de la muestra como para que la fuerza de interacción sea nula, la amplitud es igual a la amplitud libre A_0 y la frecuencia es su frecuencia de resonancia. Cuando la micropalanca se aproxima a la muestra, la fuerza de interacción cambia la frecuencia de resonancia de la micropalanca y hace disminuir la amplitud. Si se desfasa la respuesta de la micropalanca 90° y se utiliza ésta señal como señal de excitación, la micropalanca responderá de nuevo en resonancia [26]. Existen dos modos de operación. En el primero se mantiene la fuerza de excitación constante,

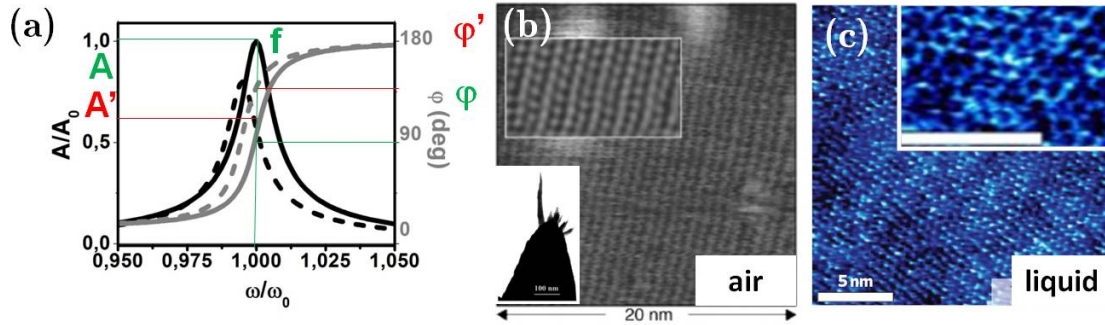


Figura 1.2: Microscopía de fuerzas en modulación en amplitud. (a) Curva de resonancia de una micropalanca, al desplazarse por la aparición de una fuerza: la amplitud y la fase cambian. (b) Imagen de topografía sobre una muestra de un cristal de poli-diacetileno con resolución molecular en aire tal y como aparece en [15] y (c) imagen de topografía sobre una muestra de mica muscovita tal y como aparece en [17].

y en el segundo se mantiene la amplitud constante. Para operar en éste último es necesario también incluir una ganancia que contrarreste la pérdida en amplitud causada por la fuerza de interacción. Se fijará entonces un determinado cambio en la frecuencia de resonancia Δf_0 de trabajo (véase figura 1.3a). Cuando la micropalanca comienza a escanear y atraviesa una zona donde existe una diferencia en altura, o una diferencia en las propiedades físicas que la describen, cambia su frecuencia de resonancia y el escáner en z desplazará verticalmente la muestra para variar z_c de tal forma que este cambio Δf_0 sea igual al Δf_0 de trabajo. Se obtendrá entonces una imagen de topografía a partir del registro del movimiento del escáner, e imágenes en el canal auxiliar de disipación (la fuerza dada a la micropalanca para mantener su amplitud igual a la de trabajo). El transitorio en este caso ($\tau = \frac{1}{\omega_0}$) no depende del factor de calidad Q . Por esta razón, FM-AFM ha sido usado históricamente en UHV, donde la dependencia en Q del transitorio del AM-AFM hacía imposible utilizar AM-AFM. La electrónica que hace posible este modo consta de PLL (phase lock loop). Un PLL es básicamente un dispositivo electrónico que compara la fase de la señal de entrada con la fase de la señal de referencia y ajusta la frecuencia para mantener esas fases iguales. La magnitud utilizada en la realimentación en FM-AFM (la frecuencia de resonancia) es más sensible que la utilizada en AM-AFM (la amplitud) [27]. Esto provoca que AM-AFM no pueda ser operado bajo fuerzas de interacción tan pequeñas como las que FM-AFM permite [27, 28]. Por otra parte, la técnica FM-AFM produce imágenes regulares de resolución atómica. Existen dudas acerca de si esto es debido al modo de operación, como lo era en contacto, a la ley de fuerzas o a la diferencia de las micropalancas utilizadas en ambos modos. En UHV se obtuvieron imágenes con resolución atómica de la reconstrucción 7×7 del Si(111) utilizando amplitudes grandes [29] y amplitudes pequeñas $A_0 = 1.2$ nm [30, 31]. En líquidos, las fuerzas atractivas de larga distancia están apantalladas por las moléculas polares del disolvente. Esto significa un aumento de la posibilidad de

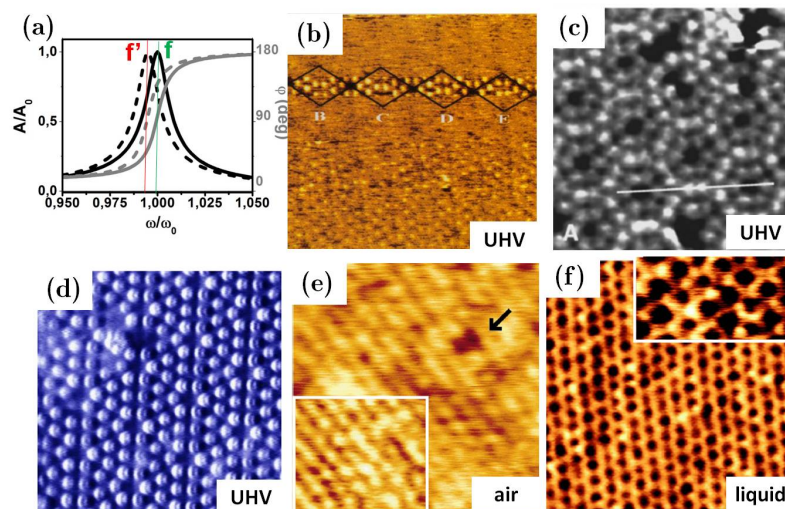


Figura 1.3: (a) Efecto en la curva de resonancia al desplazarse ésta por la aparición de una fuerza: la frecuencia de resonancia cambia. Imágenes de topografía sobre una muestra de Si(111) (reconstrucción 7x7) con resolución atómica en UHV tal y como aparecen en (b) [29], (c) [30] y (d) [31]. (e) Imágenes de topografía sobre monocapas autoensambladas de alcanotioles sobre oro (111) en aire tal y como aparece en [33] y (f) imágenes de topografía sobre una muestra de mica muscovita en líquidos tal y como aparece en [32].

obtener resolución atómica sin tener que disminuir la amplitud libre. Sin embargo, la baja Q incrementa el ruido en la frecuencia y da lugar a una baja sensibilidad. Sin embargo, mejoras en el aparato experimental que lo hicieron más robusto y maximizaron la relación señal/ruido permitieron en el 2005 que el grupo de Yamada obtuviera imágenes con resolución atómica real en líquidos [32]. Este aparato permitiría tomar también imágenes con resolución molecular en aire [33] y líquidos [34]. Otros grupos han mejorado también el montaje experimental obteniendo imágenes de alta resolución líquidos [35, 28].

1.3.3. Reto científico

El amplio interés que el microscopio de fuerzas atómico suscita tiene dos razones bien diferenciadas. Por una parte, su aplicación en el campo de la física aplicada. Campos tan diferentes como la biología [36, 37, 38], la medicina [39, 40], la nanotribología [41, 42, 43] y la ciencia de materiales [44, 45, 46] toman ventajas de esta forma de microscopía.

Por otra parte, el AFM proporciona un medio de comprobación experimental de la validez de expresiones teóricas. Las micropalanca presentes en el microscopio presentan un óptimo medio para analizar la dinámica de osciladores no lineales, y como tales, en su oscilación se pueden observar fenómenos de caos, bifurcaciones... [47, 48, 49]. Por otra parte, la microscopía de fuerzas permite analizar las fuerzas a

escala nanométrica, donde las propiedades de los materiales pueden cambiar ostensiblemente [17, 19]. De esta forma el AFM es una herramienta óptima para estudiar los modelos teóricos de las fuerzas de superficie.

Bajo mi punto de vista existen varios retos importantes que la microscopía de fuerzas atómica afronta en el futuro próximo:

- La combinación de imágenes tomadas a pequeñas fuerzas y con alta resolución lateral. Para ello es necesario mejorar la relación señal/ruido. Ésta puede ser mejorado disminuyendo el ruido electrónico o incrementando la señal. El primer camino ha sido ya implementado por diversos grupos con resultados óptimos [8, 18, 32]. El segundo consiste en aumentar la señal mediante la búsqueda de canales auxiliares de una sensibilidad mayor. Éste es el camino que se tomará a lo largo de esta tesis, y que en la actualidad también han seguido otros grupos [50, 51, 52, 53].
- La interpretación cuantitativa de los resultados. Para ello es necesario, por una parte, realizar desarrollos teóricos que relacionen la fuerza de interacción con los parámetros de la oscilación medidos en la imagen. Por otra parte, es también necesario realizar un trabajo riguroso de calibración de los parámetros, especialmente en líquidos.

1.4. Modo de operación de un AFM

En la figura 1.4 se muestran detalles de un AFM fabricado por Asylum Research donde se señalan los elementos que comúnmente lo constituyen:

- El cuerpo principal del microscopio se compone de dos partes; la parte inferior incluye el **escáner** sobre el que se coloca la muestra a medir. El escáner está formado por piezoeléctricos en las direcciones correspondientes al plano horizontal xy y en el plano vertical z . Estos piezoeléctricos se expanden o contraen cuando se aplica un voltaje entre sus extremos y facilitan la realización de movimientos precisos muy pequeños; existen escáneres cuyo rango total de medida es de sólo $4\ \mu\text{m}$. La parte superior contiene lo que se denomina **cabeza** del microscopio. Es una de sus partes más importantes y costosas, donde se genera el haz láser y donde se encuentra el fotodiodo que se utiliza como sistema de detección. También es donde se acopla el portamicropalanca en el que se incluye el piezoeléctrico que sirva para hacer oscilar la micropalanca. En algunos casos, el escáner puede ir incluido en la parte superior del cuerpo principal, de tal forma que lo que se mueve al realizar el barrido no es la muestra a escanear sino la micropalanca.
- El **controlador** es el elemento que contiene a la electrónica del microscopio, responsable del procesamiento de la señal recibida desde el fotodiodo y de la realimentación del sistema.

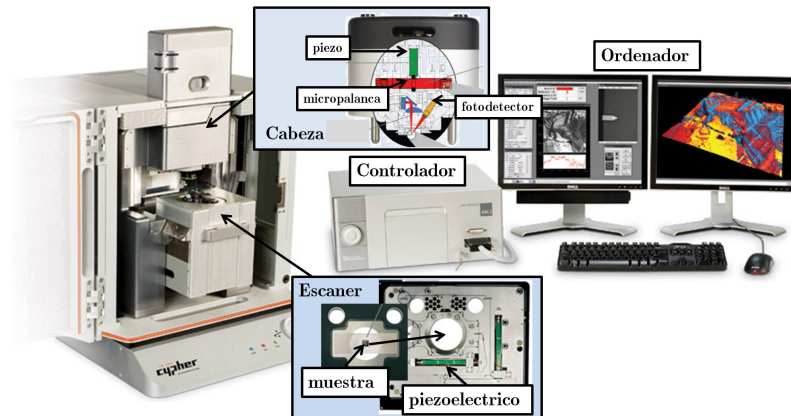


Figura 1.4: Fotografías de un AFM fabricado por Asylum Research. El cuerpo principal del microscopio incluye el escáner sobre el que se coloca la muestra y la cabeza en la que se encuentra el sistema de detección y donde se coloca el portamicropalanca. El cuerpo principal está conectado al controlador que contiene la electrónica del sistema y al ordenador donde se visualiza la imagen en tiempo real y se modifican los parámetros.

- El ordenador procesa las señales recibidas desde el controlador a través de un programa de interfaz visual, de tal forma que se pueden controlar los parámetros relacionados con la adquisición de la imagen y observar las imágenes en tiempo real.

A continuación se presenta un resumen de los pasos que se han de seguir para obtener una imagen a través de un AFM en modulación de amplitud. El uso de un AFM no es ni inmediato ni particularmente sencillo debido al gran número de parámetros que se pueden variar. El usuario ha de estar familiarizado con el instrumento para sacarle el mayor rendimiento posible.

1.4.1. Preparación de las muestras

El primer paso para llevar a cabo la adquisición de imágenes de una muestra consiste en preparar la muestra que se va a medir. Para ello se coloca la muestra deseada sobre un *portamuestras* en general metálico que se une mediante un imán al escáner piezoeléctrico del microscopio. La muestra se pega al portamuestras con celo de doble cara, pintura de plata o pegamento si se prefiere una mayor fijación. La preparación correcta de las muestras es un paso esencial para la obtención de imágenes con resolución molecular. En el caso de muestras no biológicas, es fundamental la limpieza previa del sustrato. En el caso de muestras biológicas es necesario la preparación fresca de la muestra (para lo que se ha de realizar la deposición de las biomoléculas justo antes de comenzar a tomar las imágenes). Para facilitar la deposición de las biomoléculas, el sustrato ha de ser plano (el uso de mica muscovita, HOPG, Au(111) está muy extendido) y estar limpio. Además, para obtener imágenes

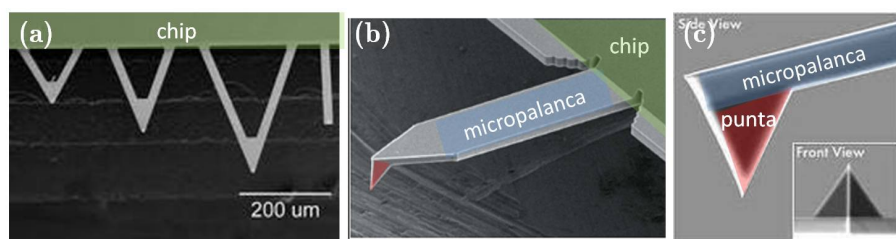


Figura 1.5: (a) Micropalancas triangulares y rectangular en el chip (b) Micropalanca rectangular de silicio con punta de silicio y (c) punta vista lateral y frontalmente.

de alta resolución es imprescindible una buena inmovilización de las biomoléculas sobre el sustrato.

1.4.2. Colocación de la punta, alineación del láser

Las micropalancas están colocadas sobre un chip para facilitar su manejo (véase figura 1.5a). En general, las utilizadas en aire son de silicio con punta de silicio por su alta constante de fuerzas k y las utilizadas en agua, más blandas, son generalmente de nitruro de silicio.

Tras colocar el chip en el portamicropalancas e insertarlo en la parte superior del microscopio, se procede a alinear el láser. La posición del láser sobre la micropalanca ha de ser tal que la señal reflejada sea optimizada, de tal forma que esto maximice la relación señal/ruido. Tras la alineación, se procederá a realizar un barrido en frecuencias para obtener la curva de resonancia de la micropalanca. Esta curva proporciona un valor para la frecuencia de resonancia y otro para el factor de calidad de la micropalanca. La micropalanca se excitará entonces en resonancia para maximizar su respuesta y optimizar su sensibilidad. Si el factor de calidad del pico de resonancia no es bueno, esto puede ser un indicativo de una mala fijación del chip o de una contaminación de la punta. Si se observa que el pico puede ser mejorado, se volverá a colocar el chip en el microscopio de tal forma que la fijación sea mejor o se limpiará la punta. Una vez obtenido un pico óptimo, se fijará una amplitud de trabajo y se acercará la punta a la muestra de forma manual utilizando los motores del microscopio. Cuando la micropalanca esté tan cerca de la muestra que usar los motores de forma manual no asegure la supervivencia de la misma, utilizaremos el enganche automático del microscopio. Éste consiste en disminuir la distancia punta-muestra a intervalos de $20 - 30 \mu\text{m}$ utilizando los motores paso a paso. Antes de pasar al paso posterior, se aplica voltaje al piezoeléctrico en z de forma que éste se estira o se contrae (el rango máximo es de $3 - 7 \mu\text{m}$) y se comprueba que en ese rango la amplitud no ha disminuido con respecto al valor de la amplitud libre. Si esto no ha ocurrido, se continúa disminuyendo la distancia punta-muestra sucesivamente hasta que se detecta una disminución en el valor de la amplitud.

1.4.3. Adquisición de imágenes

Una vez la punta ha reducido su amplitud a la amplitud de trabajo (comúnmente conocido como que *la punta ha enganchado*) se puede comenzar a tomar imágenes sobre los canales sobre los que se desea obtener información. La electrónica del microscopio consta de lock-in amplifiers que permiten extraer la amplitud y desfase de una señal con respecto a una segunda señal de referencia introducida. El caso más común es aquél en el que la señal de referencia introducida es la misma que la que excita la micropalanca, proporcionando los valores de A y ϕ de la oscilación. En el caso de tener lock-ins adicionales, es posible calcular la respuesta de la micropalanca a frecuencias distintas de la frecuencia de oscilación y obtener así imágenes en canales adicionales. Además, también es posible variar el ancho de banda del lock-in correspondiente para así filtrar más o menos ruido.

A continuación se elige el rango de barrido de la imagen, el número de píxeles de ésta y la frecuencia de barrido. Estos parámetros dependerán de la muestra a observar. Si se quiere medir con resolución atómica el rango de barrido ha de ser pequeño (4-10 nm). Si se quieren medir estructuras grandes, como por ejemplo células, el rango de barrido ha de ser del orden de μm . El número de píxeles ha de ser optimizado para así optimizar la resolución (nm/píxeles). La frecuencia de barrido de un microscopio comercial puede variar entre 0.5 – 4 Hz por línea y depende de las micropalancas y de la electrónica del microscopio utilizadas. La frecuencia ha de ser incrementada en el caso de medir sobre muestras frágiles (para minimizar la fuerza), de intentar minimizar el ruido térmico (para optimizar la resolución) o de estar interesados en barridos sobre áreas pequeñas.

Se eligen también las ganancias integral y proporcional del controlador Proporcional Integral (PI). En cada píxel, el controlador calcula un error dado por la resta entre la amplitud medida en dicho píxel y la amplitud de trabajo. La ganancia proporcional del PI es proporcional a esta señal error, mientras que la ganancia integral depende del error acumulado. Ajustando estas dos variables el controlador ordena al piezoeléctrico del escáner desplazarse una determinada cantidad en el eje z que haga cero la señal error, manteniendo así la amplitud igual a la amplitud de trabajo. Es necesario calcular los valores de las ganancias diferencial e integral a través del método de prueba y error, especialmente si las muestras a medir varían mucho en topografía. Si la muestra es plana, la ganancia proporcional no influye demasiado. Un valor excesivamente alto de las ganancias pueden llevar a oscilaciones en el piezoeléctrico que provocan ruido electrónico observable en la imagen. Un valor demasiado bajo haría sin embargo que la punta no siguiera bien la topografía de la muestra, suavizando los bordes. El piezo en z es el responsable de la señal de topografía. A través de la variación de su posición para mantener la amplitud constante es posible obtener un mapa topográfico de la muestra. Para escanear la muestra, la electrónica del microscopio manda señales de voltaje a una frecuencia rápida (eje x) y otra lenta (eje y) al piezoeléctrico en x e y del escáner sobre el que la muestra está apoyada generando así un movimiento rectangular de las dimensiones

deseadas.

1.4.4. Calibración de los parámetros

Para utilizar correctamente un AFM es necesario calibrar diversos parámetros.

Sensibilidad de los piezoelectricos

La sensibilidad de los piezoelectricos que constituyen el escáner viene dada por lo que el material se expande o contrae por cada voltio aplicado y depende del escáner utilizado. Ha de ser calibrada de forma regular (entre 3 y 6 meses). Para su calibración se utilizan muestras de una periodicidad conocida, tanto en el plano horizontal, como en la dirección vertical.

Sensibilidad del fotodiodo

Su calibración es necesaria para transformar los mV en que se mide la amplitud que llega al fotodiodo en los nm reales que oscila la punta de la micropalanca. Para ello, el método más comúnmente utilizado es el de tomar una curva de deflexión-desplazamiento del piezo en modo contacto. Si se supone que la muestra es lo suficientemente dura para que no sea deformada por la micropalanca, cada nm de desplazamiento del piezo en z corresponde a un cambio de $1 nm$ en la deflexión de la micropalanca. Calculando la inversa de la pendiente de esta curva se puede obtener la inversa de la sensibilidad del fotodiodo InvOLS (inverse optical lever sensitivity) en nm/V . Utilizando aproximaciones teóricas es posible obtener la sensibilidad del fotodiodo también a partir de curvas de fuerza en el modo dinámico [54].

El problema de utilizar este método de calibración es que al hacer la curva de fuerza es muy probable que la punta sea dañada. Por esta razón si lo que se quiere es tener un valor orientativo para la adquisición de imágenes, hacemos un experimento con una micropalanca de ese tipo, y utilizamos en experimentos sucesivos el mismo valor para las demás micropalancas de ese tipo. Sin embargo, si estamos interesados en medidas cuantitativas, es indispensable llevar a cabo la calibración cuando se ha terminado de tomar imágenes. Este método de calibración es el más extendido, pero existen otros métodos de calibración no invasivo que en algunos casos podría ser utilizado [55, 56].

Constante de fuerzas

La constante de fuerzas de una barra delgada viene dada por [57]:

$$k = \frac{3Ebh^3}{4L^3} \quad (1.1)$$

donde E es el módulo de Young del material del que está hecha la micropalanca, y b , h y L la anchura, grosor y longitud de la misma. Si bien el valor de E no cambia

apreciablemente de una micropalanca a otra, y el valor de b y L se pueden medir fácilmente con un microscopio óptico, los valores de h tienen un error alto debido a las condiciones de fabricación. Ésta es la razón de que la k se pueda desviar bastante del valor nominal proporcionado por el fabricante. Por ello es necesario calibrar la constante de fuerzas en cada experimento. Para ello los dos métodos más extendidos son [58, 59]:

- El método de Sader [60]. Consiste en calcular k a partir de la aplicación de la expresión:

$$k = \frac{\pi}{16} \rho b^2 L \omega \Gamma''(\omega) \quad (1.2)$$

donde $\Gamma''(\omega)$ es la parte imaginaria de la función hidrodinámica en aire (que veremos con más detalle en el capítulo 2) De esta forma, ajustando la curva de resonancia de la micropalanca en aire a una lorentziana y obteniendo ω_0 y Q , y midiendo la anchura b y longitud L de la micropalanca con un microscopio óptico se puede estimar la k de la micropalanca. Este método es muy sencillo de utilizar desde el punto de vista experimental, pero únicamente es válido para micropalancas rectangulares.

- El método del ruido térmico [61] es válido para todo tipo de micropalancas. Se basa en el teorema de equipartición, del que se deduce que el valor medio de cada grado de libertad de la energía ha de ser igual a la energía térmica $k_B T/2$, de tal forma que se puede obtener una relación para k que depende de la constante de Boltzmann k_B , la temperatura absoluta T y el desplazamiento medio debido al ruido térmico $\langle x \rangle^2$:

$$k = \frac{k_B T}{\langle x \rangle^2} \quad (1.3)$$

Para ello es necesario hallar $\langle x \rangle^2$ en nm a través del espectro de ruido térmico de la micropalanca (en mV) y de la sensibilidad del fotodiodo (que permite transformar los mV a nm). El uso de este método es limitado debido a que depende de la posibilidad de la medición del espectro de ruido térmico. Por ejemplo, una micropalanca de $k \approx 40$ N/m en aire oscilará muy poco debido al ruido térmico, de tal forma que si no se ha minimizado el ruido electrónico esta oscilación no será detectable y el método no podrá ser aplicado.

1.4.5. Procesamiento de las imágenes

El post-procesamiento de las imágenes obtenidas es esencial para su estudio e interpretación. Los programas de post-procesamiento permiten realizar multitud de tareas, pero es preciso preservar siempre las imágenes sin procesar y mantener un consistente registro de las operaciones realizadas. Es importante no filtrar la imagen demasiado, puesto que esto puede introducir efectos artificiales. Entre los operadores más utilizados que se pueden aplicar se encuentran:

- Nivelación de la imagen. La mayoría de imágenes de AFM requieren una nivelación, debido a diversos factores (posible inclinación de la muestra, efectos debidos al escáner, deriva térmica...). Para ello se puede, bien sustraer un plano a la imagen total, o bien nivelar la imagen línea a línea. Cuando existen elementos de una altura significativa, éstos no se han de tener en cuenta para el cálculo de la nivelación.
- Combinación de imágenes. Cuando se tienen dos imágenes correspondientes a dos canales diferentes es muy ilustrativo combinarlas de tal forma que sea posible ver la información total en una misma imagen. Lo más común es incluir la información de la primera imagen en una imagen tridimensional y la información adicional como un mapa de colores superpuesto sobre la imagen tridimensional [62].
- Filtrar la imagen. Se filtran las imágenes para así eliminar ruido a la frecuencia deseada. Uno de los filtros más comunes para el análisis de imágenes con resolución atómica consiste en realizar una transformada de Fourier, filtrar el rango de frecuencias deseado, y realizar la transformada inversa de tal forma que se reconstruye la imagen ya filtrada. También es común la interpolación del valor de la imagen en un píxel basado en el valor medio de ésta en los píxeles contiguos
- Análisis de la imagen. Facilita, entre otras cosas, la extracción de perfiles a lo largo de la línea deseada, el cálculo de la media de estos perfiles a lo largo del rango de líneas deseadas y el análisis estadístico de una superficie en cuanto a parámetros relacionados con su rugosidad.

1.5. Trabajos destacados

En esta sección se presentan los trabajos más significativos que, desde mi punto de vista, la microscopía de fuerzas ha hecho posible y que marcarán el camino futuro de la investigación.

1.5.1. Microscopía de fuerzas a velocidad de vídeo

Desde el año 1991 hubo intentos de incrementar la velocidad en la adquisición de imágenes mediante AFM [63]. Esto tiene particular importancia en biología, donde la adquisición de imágenes a velocidad de video permitiría observar procesos biológicos en tiempo real. La velocidad de un AFM está limitada principalmente por la velocidad a la que la realimentación puede operar de forma que la topografía se siga de forma precisa y no se apliquen fuerzas altas sobre la muestra. Para incrementarla, todos los elementos presentes en el bucle de realimentación han de ser optimizados. Por ejemplo, para reducir el tiempo entre píxel y píxel es necesaria la utilización de

micropalanca con frecuencia de resonancia alta ($f_0 \approx 2.5$ MHz). Para combinar una frecuencia de resonancia alta con una constante de fuerzas baja ($k \approx 0.2$ N/m) que minimice la fuerza aplicada, es necesario utilizar micropalanca muy pequeñas (140 nm de espesor, 2 μ m anchura, y 10 μ m de longitud). El mayor problema del uso de micropalanca pequeñas es el tamaño del haz láser que se refleja sobre ellas, que ha de ser minimizado para poder incidir dentro de su superficie. En los últimos años existen microscopios comerciales que han optimizado la óptica del microscopio y reducido el tamaño del haz láser para hacerlo compatible con el uso de micropalanca pequeñas. Entre los años 2001-2010, el grupo de Toshio Ando ha optimizado uno a uno éste y el resto de los elementos relacionados con el bucle de realimentación (escáner utilizado, velocidad de la electrónica...) [64, 65, 66, 67]. El AFM del grupo de Toshio Ando tiene hoy en día capacidad de capturar imágenes a 30-60 ms/marco al escanear un rectángulo de 250 nm y con una operación de la realimentación suficientemente rápida que permite tomar imágenes de las proteínas sin dañarlas. Es importante comparar estos valores con los característicos de un AFM comercial. En este caso, la frecuencia máxima de adquisición de una imagen en el mismo área es de 4 Hz por línea, lo que se traduce en que una imagen de 256 líneas se tardaría en tomar aproximadamente 32 s. A continuación se presentan dos experimentos realizados utilizando la técnica de microscopía de fuerzas a velocidad de vídeo.

Visualización de cambios estructurales en la bacteriorhodopsina en respuesta a cambios en la iluminación

La bacteriorhodopsina (bR) es una proteína de membrana que se encuentra en la bacteria *Halobacterium salinarum* y cuya función es actuar como una bomba de protones dirigida por luz. Estas proteínas se autoensamblan formando membranas bidimensionales conocidas como membrana púrpura por el color violeta de la proteína. Cuando absorbe luz, la bacteriorhodopsina cambia su conformación y se activa su función como bomba de protones. La luz que induce el cambio estructural puede ser utilizada para crear los interruptores moleculares que habrán de sustituir a los interruptores electrónicos presentes en las puertas de los transistores. Estos interruptores moleculares prometen una reducción del tamaño y una mejora en la rapidez. Con la microscopía de fuerzas de alta velocidad es posible observar los cambios conformacionales de la bacteriorhodopsina provocados por iluminaciones de diferentes longitudes de onda (véase figura 1.6a). La velocidad de éstos están dentro del tiempo de resolución del estudio (1marco/s) [18]. En la figura 1.6b se observan fotogramas del vídeo correspondiente a estos experimentos. En la primera imagen la red de proteínas está en su posición estable. Luego es iluminada con luz verde ($\lambda = 532$ nm) y se observa el cambio que se produce en su conformación, cambio que es reversible cuando se vuelve a iluminar la proteína con luz azul ($\lambda = 408$ nm).

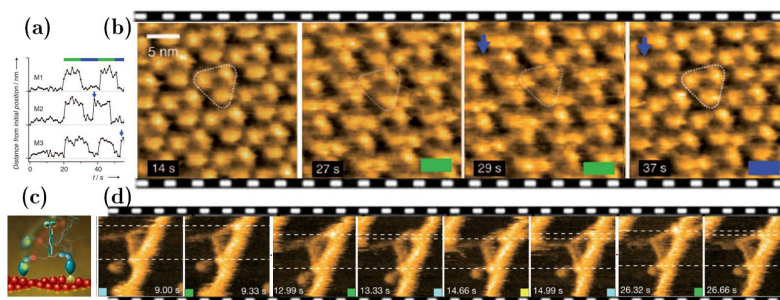


Figura 1.6: (a) Desplazamiento del centro de masa de la proteína bR cuando se aplica luz verde y azul y (b) secuencia de imágenes correspondientes a la fotoactivación de la bacteriorhodopsina tal y como aparece en [18] (c) Esquema del motor molecular miosina V y (d) secuencia de imágenes correspondientes a su movimiento sobre el filamento de actina tal y como aparece en [68].

Visualización del movimiento de la miosina sobre filamentos de actina

La miosina es un motor molecular responsable de la contracción de los músculos. Su movimiento a lo largo de filamentos de actina causan un movimiento de las células parecido al de una oruga. La suma del efecto de muchas miosinas empujando resulta en la contracción de los músculos. Esta interacción ya había sido modelada mediante hipótesis e imágenes estáticas. Por primera vez, la microscopía de fuerzas a velocidad de video hizo posible corroborar estos modelos y revelar detalles adicionales del comportamiento de estas proteínas [68]. En la figura 1.6c se observan algunos de los fotogramas pertenecientes al video que registra el movimiento de la miosina a lo largo del filamento de actina. Los colores presentes en los fotogramas representan conformaciones diferentes que la miosina toma para moverse a lo largo de los filamentos.

1.5.2. Primera imagen de los átomos de una molécula

Recientemente, Leo Gross y colaboradores del centro de IBM en Zúrich [69] lograron visualizar la estructura química de la molécula de pentaceno. El pentaceno es una molécula orgánica cuya longitud es aproximadamente 1.4 nm y está formada por 22 átomos de carbono y 14 de hidrógeno. El espaciamiento entre los átomos de carbono es de tan sólo 0.4 nm. La molécula fue observada con una resolución no vista hasta la fecha utilizando FM-AFM en ultra-alto vacío y bajas temperaturas. La visualización fue posible gracias a la funcionalización del extremo de la punta con moléculas de CO y a la ausencia de realimentación en la imagen, que fue tomada a una distancia punta-muestra z_c constante. Lo asombroso de las imágenes de Gross y colaboradores, que se presentan en la figura 1.7a, es su parecido con las imágenes que hasta ahora sólo habían sido posible ver en libros de texto de química elemental.

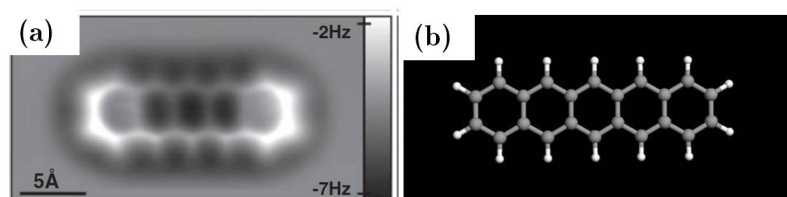


Figura 1.7: (a) Imagen de la molécula de pentaceno en el canal de Δf tal y como aparece en [69] y (b) Esquema de la molécula de pentaceno que muestra los anillos de carbono rodeados de átomos de hidrógeno.

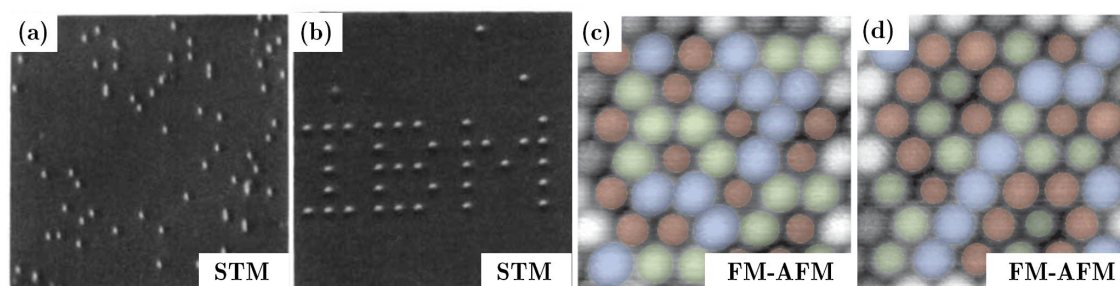


Figura 1.8: (a)-(b) proceso de la colocación de átomos de Xe utilizando STM tal y como aparece en [70] (c)-(d) Proceso de la identificación y colocación de átomos utilizando FM-AFM tal y como aparece en [71].

1.5.3. Manipulación de átomos sobre una superficie no conductora

En el año 1989, Don Eigler y colaboradores, también en IBM, fueron los primeros de la historia en mover un átomo individual. En la figura 1.8a se muestra cómo Eigler fue capaz de escribir las siglas de la empresa en la que trabajaba con 35 átomos de Xenon. Para ello utilizó un microscopio de efecto túnel. Este hito fue un paso de gigante en el campo de la nanotecnología [70].

El microscopio de fuerzas, al igual que su predecesor el STM, tenía también el reto último de manipular átomos sobre una superficie. En el año 2007, científicos japoneses y españoles, mostraron la capacidad de su AFM para no sólo mover los átomos a lo largo de superficies no metálicas, sino también de identificarlos [71]. Y en el año 2008, fueron estudiadas las fuerzas necesarias para mover un átomo a lo largo de una superficie [72].

1.5.4. Visualización de cambios estructurales en redes de proteínas

El microscopio de fuerzas en modo contacto es una herramienta complementaria a la cristalografía por rayos X y a la microscopía electrónica en la investigación

de proteínas de membrana debido a que puede proporcionar información estructural de la organización supramolecular de las membranas con resolución nanométrica.

Si se minimiza la fuerza aplicada en modo contacto ajustando la concentración de electrolitos, el pH del buffer, y los parámetros de la oscilación, de tal forma que no exista deformación, las imágenes de topografía de las proteínas pueden tener una resolución lateral de 0.5 nm y vertical de 0.1 nm. Esta resolución sub-molecular es necesaria para obtener información de la estructura, de los cambios conformacionales y de la organización de las proteínas a nivel supramolecular. Así, la microscopía de fuerzas en modo contacto en líquidos ha permitido observar detalles submoleculares de proteínas medidas bajo condiciones fisiológicas [24, 73, 74, 75] y los cambios conformacionales de las proteínas inducidos por un cambio en sus propiedades fisiológicas [76, 76]. La alta relación señal/ruido que proporciona el AFM en modo contacto es fundamental para mejorar la resolución. Además, esta relación señal/ruido suele ser aumentada promediando localmente las imágenes obtenidas.

Bacteriorhodopsina

En particular, el grupo de Engel en Basilea ha aplicado la microscopía de fuerzas en modo contacto para registrar los cambios que tienen lugar en la topografía de la superficie citoplasmática de la membrana púrpura (bacteriorhodopsina) inducidos por un cambio en la fuerza aplicada [77, 76]. Si la fuerza aplicada es del orden de 80 pN, las moléculas individuales de bR revelan una estructura en trímeros. Cuando la fuerza aumenta hasta los 100-180 pN, estas estructuras se transforman de forma reversible en estructuras que exhiben protusiones prominentes (véase figura 1.9c). La comparación entre las imágenes de AFM y la estructura conocida de la bacteriorhodopsina permite relacionar el cambio conformacional con el combado de uno de los bucles de la proteína [77].

Acuaporina

Las acuaporinas son proteínas de membrana encargadas del transporte de agua en las células. En particular, la porina OmpF es una proteína de membrana de la bacteria *Escherichia coli* que consiste en 16 hélices β antiparalelas. Generalmente, forman estructuras de trímeros cada uno de ellos conteniendo un poro por el que pasan las moléculas de agua. Están conectados por lazos pequeños en la superficie periplasmática (véase modelo de la figura 1.10a) y por lazos largos en la superficie extracelular, los cuales forman un dominio que sobresale 1.3 nm por encima de la bicapa (véase figura 1.10b). Las imágenes de AFM en modo contacto proveen la resolución suficiente como para observar estas diferencias (véanse figuras 1.10c-d). El dominio que sobresale en la superficie extracelular puede ser desplazado al centro, lo que resulta en un cambio en la estructura (cuya altura pasa a ser de 0.6 nm y cuya forma cambia) bajo determinadas condiciones: la aplicación de un potencial eléctrico superior a 200 mV, la generación de un gradiente electrolítico de K^+ superior a 0.3 M y pH ácido (≈ 3). En la figura 1.10e se observa mediante AFM en modo contacto

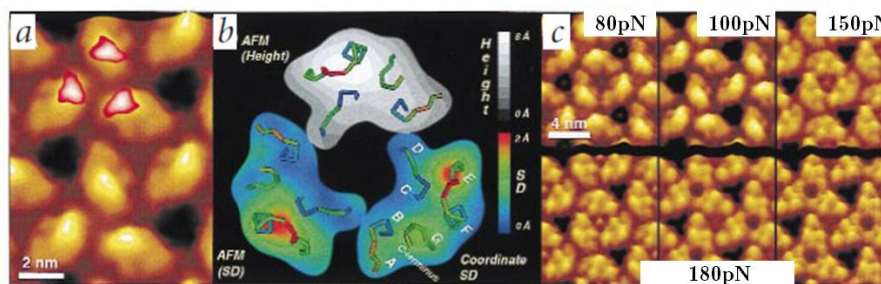


Figura 1.9: (a) Promedio de correlación de una imagen de AFM de bR bajo una fuerza aplicada de 100 pN. La imagen de AFM muestra la protusión que representa el lazo EF. (b) Esquema de la proteína bR. (c) Análisis estadístico que revela los cambios estructurales de la proteína producidos por un cambio en la fuerza. De izquierda a derecha (arriba), las imágenes fueron tomadas bajo la aplicación de 80, 100 y 150 pN respectivamente, y muestran la desaparición del lazo EF y la aparición de lazos de polipéptidos más cortos de la superficie citoplasmática. Abajo, imágenes de tres conformaciones de los trímeros adquiridos bajo la aplicación de 180 pN. Las imágenes se muestran tal y como aparecen en [76].

el cambio conformacional correspondiente a un cambio del pH del buffer, y en la figura 1.10f el correspondiente a un aumento en la concentración de electrolitos.

1.5.5. Adquisición simultánea de la flexibilidad de proteínas y de su topografía

La microscopía de fuerzas es una herramienta que no ha de limitarse a la adquisición de imágenes, ya que tiene capacidad para aportar también información a nivel cuantitativo de las propiedades de una muestra a escala nanométrica. Para ello es necesario combinar la adquisición de imágenes de alta resolución con un método que facilite una relación entre los canales experimentales y la fuerza de interacción. En el año 2007, O.Sahin y colaboradores propusieron un método innovador para llevar a cabo este reto [50]. A través de una modificación en la forma de la micropalanca que la hace asimétrica se pueden registrar cambios en la fuerza a través de cambios en la torsión de la micropalanca. Esto proporciona una relación señal/ruido alta que, unida al conocimiento de la función de transferencia torsional, permite la reconstrucción del comportamiento temporal de la fuerza de interacción. Este método ha permitido determinar con resolución molecular la flexibilidad y el módulo de Young efectivo de redes de bR sobre mica [78]. En la figura 1.11a-b se observa una imagen experimental adquirida mediante esta técnica, y en la figura 1.11c-e se muestra la reconstrucción de la flexibilidad de la proteína de membrana, tanto sobre la parte extracelular como sobre la citoplasmática.

Este método posibilita la adquisición de información cuantitativa de la muestra de forma rápida (la misma que la velocidad de adquisición de la imagen) de tal

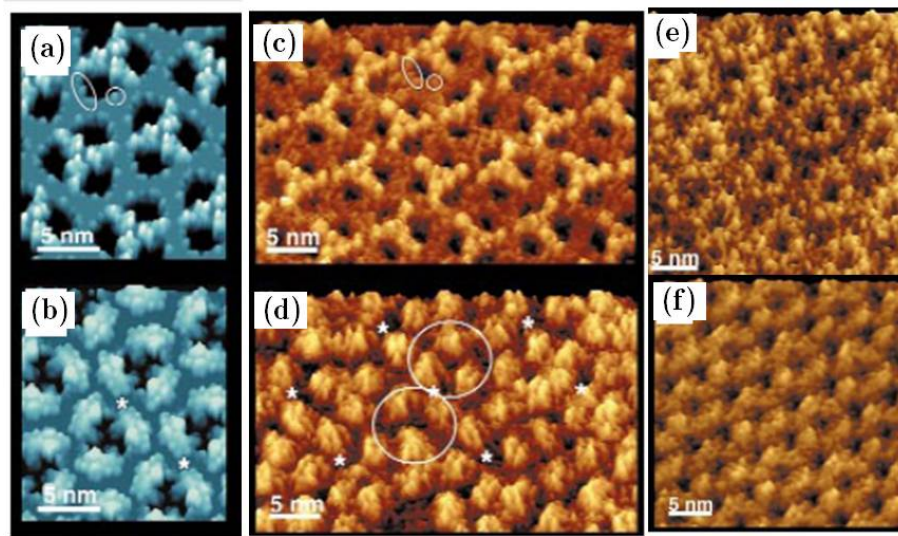


Figura 1.10: Modelos atómicos de la (a) superficie periplasmática y (b) superficie extracelular de la porina OmpF18. Imágenes de AFM que muestran (c) la superficie periplasmática y (d) la superficie extracelular. (e) Cambio conformacional de la superficie extracelular dependiente del pH y (f) cambio conformacional inducido por un gradiente en la concentración de electrolitos >300 mM tal y como aparecen en [76].

forma que se pueden registrar cambios en las fuerzas de interacción que ocurren en la escala de milisegundos. Además, la combinación de imágenes de alta resolución y de la estimación de la flexibilidad de las proteínas bajo condiciones fisiológicas proporcionan relaciones más precisas para determinar su función y estructura.

1.6. Enfoque del trabajo

Esta tesis se pretende enfocar a lo presentado en las dos últimas secciones. El trabajo se orienta a la adquisición de imágenes de alta resolución en líquidos utilizando la microscopía de fuerzas y a la estimación cuantitativa de las constantes de acoplo de la interacción a través de esas imágenes. Para mejorar la resolución de las imágenes en líquidos se utilizará la microscopía de fuerzas bimodal. Además, para mejorar la resolución en líquidos es indispensable un estudio teórico-experimental de la dinámica de la micropalanca en un medio fluido. Asimismo, la microscopía de fuerzas bimodal también proporcionará el marco teórico necesario para la cuantificación de propiedades nanomecánicas.

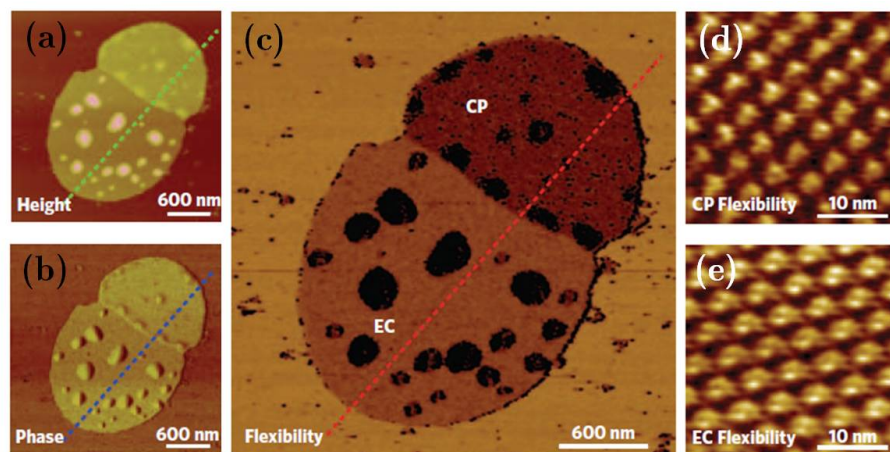


Figura 1.11: Imágenes simultáneas de (a) topografía, (b) fase y (c) flexibilidad sobre membrana púrpura depositada en mica. Imagen de flexibilidad con resolución molecular sobre la parte (d) citoplasmática y (e) extracelular de la membrana tal y como aparecen en [78].

Capítulo 2

Dinámica de la micropalanca en líquidos

2.1. Introducción: la ecuación de Navier-Stokes

El comportamiento dinámico de una micropalanca cambia cuando se introduce en un líquido. Butt [79] fue el primero en estudiar el cambio en la frecuencia de resonancia y en el factor de calidad que se produce cuando se hacen las medidas en líquido. Hoy en día, debido al uso extendido de la microscopía de fuerzas en líquidos, cualquier usuario está familiarizado con estos cambios.

El propósito de este capítulo es proporcionar al lector unas nociones básicas de mecánica de fluidos que faciliten la comprensión de las ecuaciones de movimiento que rigen el comportamiento de la micropalanca en el fluido. El medio fluido se caracteriza por una densidad ρ y una viscosidad η . En consecuencia, cualquier cambio en las propiedades de la micropalanca dependerá tanto de las fuerzas inerciales como de las viscosas. Es importante conocer en qué medida afectan las fuerzas inerciales y viscosas a los dos parámetros interesantes para el estudio de la dinámica de la micropalanca: el factor de calidad Q y la frecuencia de resonancia ω_0 .

La hipótesis fundamental en la que se basa la mecánica de fluidos es la hipótesis del medio continuo. Esto quiere decir que las funciones locales están bien definidas y su valor corresponde al de las funciones a nivel macroscópico (temperatura, densidad, presión). La hipótesis de continuidad considera.

1. Que el medio es un continuo que llena el espacio.
2. Que los campos tienen valores perfectamente determinados en cada punto e instante.
3. Que las magnitudes físicas vienen descritas por funciones continuas y derivables en un entorno determinado por el recorrido libre medio λ (distancia promedio que recorre una partícula del fluido antes de interactuar con otra). Si la longitud característica del sistema a estudiar es menor que el recorrido

libre medio, debe utilizarse la mecánica estadística para predecir el comportamiento de la materia.

La ecuación de Navier-Stokes modela el comportamiento de un fluido viscoso. Viene dada por:

$$\rho \frac{D\vec{u}}{Dt} = -\vec{\nabla}p + \vec{\nabla}\vec{T} + \vec{f}_{\text{hydro}} \quad (2.1)$$

donde \vec{u} es la velocidad, p la presión, \vec{T} el tensor de esfuerzo y \vec{f}_{hydro} la fuerza hidrodinámica por unidad de volumen que actúa sobre el fluido. La derivada material $\frac{D\vec{u}}{Dt}$ de la velocidad se define como:

$$\frac{D\vec{u}}{Dt} = \left(\frac{\partial}{\partial t} + \vec{u} \cdot \vec{\nabla} \right) \vec{u} \quad (2.2)$$

El primer término que aparece en la derivada material es la derivada local y representa la variación en el tiempo que experimenta una partícula fija en un punto del espacio. El segundo es la derivada convectiva y representa la variación que experimenta el campo asociada al cambio de posición de las partículas que se mueven en él.

Para comprender la teoría necesaria para obtener las soluciones de la ecuación de Navier-Stokes es necesario introducir algunos conceptos y definiciones básicos de dinámica de fluidos.

2.1.1. Conceptos básicos de dinámica de fluidos.

Números adimensionales y semejanza dinámica.

El análisis dimensional es la herramienta que más simplifica la metodología de la dinámica de fluidos. Este método permite obtener información de un flujo a partir de experimentos a otra escala y es ampliamente utilizado en la construcción de barcos y aviones. Sea un cuerpo de longitud L atravesando un fluido de densidad ρ , viscosidad η y velocidad U , entonces existe una magnitud que permanece inalterable $\rho UL/\eta$ y define las condiciones físicas del experimento. Esto quiere decir que el uso de otra escala L del objeto unido al correspondiente cambio en la densidad ρ o viscosidad η del fluido no alteran en ninguna forma el flujo. De esta forma el flujo no es una función de ρ , U , η y L sino de $\rho UL/\eta$. Esta magnitud es conocida como número de Reynolds; es uno de los números adimensionales más importante en dinámica de fluidos porque nos da una estimación de la importancia de las fuerzas inerciales $|(\vec{u} \cdot \vec{\nabla})\vec{u}|$ respecto a las viscosas $|\nu \vec{\nabla}^2 \vec{u}|$ en la ecuación de Navier-Stokes:

$$O(\text{Re}) = \frac{|\text{F. inerciales}|}{|\text{F. viscosas}|} = \frac{|(\vec{u} \cdot \vec{\nabla})\vec{u}|}{|\nu \vec{\nabla}^2 \vec{u}|} = O\left(\frac{U^2/L}{\nu U/L^2}\right) \quad (2.3)$$

donde $\nu = \eta/\rho$ es la viscosidad cinématica del fluido.

Ecuación de continuidad

Las ecuaciones de Navier-Stokes se deducen a partir de la conservación del momento. Para describir el flujo en su totalidad es necesaria información adicional que puede venir dada por la conservación de la masa, de la energía o por la ecuación de estado, además de considerar las condiciones de contorno adecuadas en cada superficie. La conservación de la masa viene dada por la ecuación de continuidad:

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \cdot (\rho \vec{u}) = \frac{D\rho}{Dt} + \rho(\vec{\nabla} \cdot \vec{u}) = 0 \quad (2.4)$$

Clasificación cinemática de flujos

- Flujo incompresible: si las partículas no cambian su volumen, o lo que es lo mismo, si su densidad ρ es constante en un elemento de volumen que se mueve con el fluido ($\frac{D\rho}{Dt} = 0$). Teniendo en cuenta la ecuación 2.4, implica afirmar que en un fluido incompresible, la divergencia de su velocidad es cero:

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{u} = 0 \quad (2.5)$$

Si u , v y w son los componentes de la velocidad en la dirección x , y y z ($\vec{u} = (u, v, w)$) se tiene que, en coordenadas cartesianas:

$$\frac{\partial u}{\partial x} + \frac{\partial v}{\partial y} + \frac{\partial w}{\partial z} = 0 \quad (2.6)$$

- Flujo potencial: si existe una función ϕ que cumple $v = \vec{\nabla} \phi$. En coordenadas esféricas:

$$u = \frac{\partial \phi}{\partial x}; v = \frac{\partial \phi}{\partial y}; w = \frac{\partial \phi}{\partial z} \quad (2.7)$$

- Flujo irrotacional: si el rotacional de la velocidad es cero:

$$\vec{\omega} = \vec{\nabla} \otimes \vec{u} = 0 \quad (2.8)$$

La vorticidad $\vec{\omega}$ es una medida de la rotación local de los elementos del fluido, por lo que si el flujo es irrotacional, la vorticidad es nula.

- Flujo plano: si la velocidad está en el plano perpendicular a una dirección dada y es independiente de desplazamientos en esa dirección. En particular, si esta dirección viene dada por el eje x esto implica:

$$u = 0; v = v(y, z); w = w(y, z) \quad (2.9)$$

Función de corriente y función potencial.

- Si el flujo es incompresible (ecuación 2.6) y plano (ecuación 2.9) existe una función de corriente $\psi(y, z)$ que, en coordenadas cartesianas viene dada por:

$$v = \frac{\partial \psi}{\partial z}; w = -\frac{\partial \psi}{\partial y} \quad (2.10)$$

- Si el flujo es además potencial, existe una función analítica compleja $W(z)$ tal que:

$$W(z) = \phi + i\psi; \frac{dW}{dz} = u - iv \quad (2.11)$$

Flujos ideales, viscosidad y condiciones de contorno.

Un flujo ideal es aquel cuya viscosidad es cero. Las ecuaciones de Euler son las que describen el movimiento de un fluido compresible no viscoso cuando las componentes disipativas son despreciables frente a las convectivas ($Re \gg 1$):

$$\rho \frac{D\vec{u}}{Dt} = -\vec{\nabla} p \quad (2.12)$$

El modelo no restringe los valores que toma la velocidad en la interfase sólido-líquido. La discrepancia que aparece entre estos modelos y los aplicados a los fluidos viscosos (en la realidad, los fluidos son viscosos) estriba en la diferencia en las condiciones de frontera utilizadas en ambas soluciones. Stokes [80] postuló la *condición de no deslizamiento*, que establece que en las paredes del sólido, el fluido ha de tener la misma velocidad que éste. Esta condición está apoyada en numerosos experimentos (Poiseuille en 1840 y Hagen en 1839 entre otros).

Capa límite y flujo laminar.

La capa límite es la capa más cercana a la superficie donde la velocidad del fluido va desde cero al valor que tiene lejos de la superficie. Prandtl introdujo el concepto de capa límite en 1904 para resolver la controversia mencionada en el apartado anterior en relación a las condiciones de frontera. Postuló la existencia de una capa delgada de fluido junto a la superficie, en la que la velocidad se incrementa desde cero en el sólido a la velocidad del fluido en el resto del espacio. En esta capa el gradiente de velocidades es alto y los efectos de la viscosidad podrían ser importantes. La relación entre fuerzas inerciales y viscosas en la capa límite es distinta a la existente en el resto del fluido a consecuencia de que el espesor típico de la capa límite (Δ) es de un orden de magnitud diferente que la distancia típica L sobre la que varía el campo de velocidades en el resto del fluido. Por esta razón, aunque las fuerzas viscosas sean despreciables en el resto del fluido ($Re \gg 1$), no es así en la capa límite, donde, a diferencia de lo encontrado en la ecuación 2.3, se tiene que:

$$\frac{|F.\text{inercia}|}{|F.\text{viscosas}|} = O\left(\frac{U^2/\Delta}{\nu U/\Delta^2}\right) = O(\text{Re}^{-\frac{1}{2}}) \quad (2.13)$$

Hay dos tipos de capa límite:

- Laminar: el número de Reynolds es pequeño.
- Turbulenta: cuando el número de Reynolds es grande. Las líneas de flujo se cruzan unas a otras.

Las capas límite turbulentas son más anchas y producen más fuerzas de fricción que las laminares. Además, la capa límite permanece delgada y el coeficiente de disipación pequeño si el objeto es aerodinámico. Sin embargo, si no lo es, el flujo se puede separar de la superficie y provocar perturbaciones grandes en el fluido. Cuando $\text{Re} < 1$, no hay separación del flujo; sin embargo, si Re es alto, la separación de flujo puede ser la causa más importante de la disipación viscosa. Por ello, algunas veces puede ser útil transformar la capa límite de laminar a turbulenta de tal forma que no se separe de la superficie a pesar de que conlleve un aumento en las fuerzas de fricción.

2.1.2. Fuerzas hidrodinámicas

Las fuerzas inerciales y viscosas que actúan sobre la micropalanca se pueden hallar a través de la función presión hidrodinámica. La presión hidrodinámica $\Gamma(\omega)$ [81] es una función de transferencia adimensional entre las fuerzas hidrodinámicas F_{hydro} y la aceleración de la micropalanca.

Para hallar las fuerzas hidrodinámicas de un objeto oscilando es necesario hallar esta función hidrodinámica dependiente de la frecuencia. El término que causa más complicaciones para resolver la ecuación de Navier-Stokes es el de la derivada convectiva no lineal. En algunos casos se puede asumir la hipótesis de flujo incompresible, de forma que este término se simplifica. Si además el flujo es plano, existe una función de corriente ψ como la definida en la ecuación (2.10) que cumple:

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{\nu} \frac{\partial}{\partial t}\right) \nabla^2 \psi = 0 \quad (2.14)$$

En el caso particular en el que la velocidad del fluido en el sólido sea $U_0 e^{i\omega t}$ paralela a la dirección de oscilación, y que la sección sea uniforme, existe una función presión $\Gamma(\omega)$ que determina la fuerza hidrodinámica:

$$F_{\text{hydro}} = -m' U_0 i\omega \left(1 - \frac{4k'_1(\sqrt{i\beta})}{k'_1(\sqrt{i\beta}) + \sqrt{i\beta} k'_1(\sqrt{i\beta})}\right) e^{i\omega t} = -m' \Gamma(\omega) U_0 i\omega e^{i\omega t} \quad (2.15)$$

siendo $\Gamma(\omega) = \Gamma'(\omega) + i\Gamma''(\omega)$, $k'_1(\sqrt{i\beta})$ la función de Bessel de tercer tipo [82], $\beta = \omega \rho R^2 / \eta$ está relacionado con el espesor de la capa límite y m' la masa de

fluido desplazada por el movimiento del cuerpo que oscila. La parte real de la fuerza hidrodinámica es:

$$F_{\text{hydro}} = m'U_0\omega(\Gamma' \sin \omega t - \Gamma'' \cos \omega t) \quad (2.16)$$

Las fórmulas para una esfera y un cilindro oscilante son conocidas [81]:

$$\Gamma'_{\text{esfera}} = \frac{1}{2} + \frac{9}{4}\sqrt{\frac{2}{\beta}} \quad (2.17)$$

$$\Gamma''_{\text{esfera}} = \frac{9}{4} \left(\sqrt{\frac{2}{\beta}} + \frac{2}{\beta} \right) \quad (2.18)$$

$$\Gamma'_{\text{cilindro}} = 1 + 2\sqrt{\frac{2}{\beta}} \quad (2.19)$$

$$\Gamma''_{\text{cilindro}} = 2\sqrt{\frac{2}{\beta}} + \frac{2}{\beta} \quad (2.20)$$

donde $m'_{\text{esfera}} = \frac{4}{3}\pi\rho R^3$ y $m'_{\text{cilindro}} = \pi\rho R^2 L$ son las masas de fluido desplazadas por una esfera y un cilindro.

Fuerzas de rozamiento viscosas

El término de la ecuación que se opone al movimiento del cuerpo y que está en fase con la velocidad es la fuerza disipativa correspondiente a las fuerzas viscosas. Vienen dadas por la cantidad $\gamma = m'\omega\Gamma''$. Cuando un fluido viscoso fluye por una superficie existen efectos de viscosidad confinados en la capa límite que dependen de la viscosidad y velocidad del fluido, así como de la longitud de la superficie por la que el fluido fluye.

Fuerzas inerciales

El término de la ecuación que está en fase con la aceleración es el correspondiente a las fuerzas inerciales. Son causadas por el fluido que oscila al oscilar el cuerpo. Vienen dadas por la cantidad $m'\Gamma'$ o masa virtual, que depende de la frecuencia. El hecho de que las fuerzas inerciales dependan también de la viscosidad es debido a que el fluido sufre el efecto de las fuerzas viscosas a medida que se mueve junto al sólido. Si la viscosidad es cero (modelo para flujos sin fricción), la masa virtual es igual a la masa de fluido desplazada ($\Gamma' = 1$).

2.2. Acoplo hidrodinámico a la oscilación de la micropalanca: interacción sólido-líquido

2.2.1. Modelos

La aplicación de la dinámica de fluidos a la vibración de la micropalanca no es algo reciente. El primer modelo que intenta describirla de forma analítica data de 1995 [83]. A pesar de haber transcurrido ya 16 años, aún quedan múltiples preguntas por resolver en torno a esta cuestión. No tiene una solución sencilla, puesto que es necesario acoplar las ecuaciones hidrodinámicas que rigen el movimiento del fluido a las ecuaciones que rigen el movimiento de la micropalanca. Este problema se conoce generalmente como problema de interacción sólido-líquido y para resolverlo es necesario aplicar las condiciones de contorno correctas. Se distinguen tres tipos de aproximación, según el número de dimensiones consideradas.

Modelo unidimensional

También conocido como modelo de masa puntual. Consiste en modelar la micropalanca como una esfera. La ecuación que rige el movimiento de una esfera en una dimensión es:

$$m_{\text{eff}}\ddot{z}(t) + \gamma\dot{z}(t) + kz(t) = F_0 \cos \omega t \quad (2.21)$$

donde $\gamma = m_{\text{eff}}\omega_0/Q$ es el término correspondiente a la disipación, k es la constante de fuerzas de la micropalanca, y F_0 y ω son la fuerza y frecuencia de la excitación. El factor de calidad de la micropalanca es una medida de la energía que disipa en el medio. Depende tanto de las fuerzas viscosas como de las inerciales de acuerdo a:

$$Q = \frac{m_{\text{eff}}\omega}{\gamma} \quad (2.22)$$

$$m_{\text{eff}} = (m^* + m'\Gamma') \quad (2.23)$$

Además, la micropalanca no es una esfera, por lo que es necesario introducir un factor de corrección n ($m^* = nm$) dependiente de la geometría para que la relación de dispersion entre ω_0 y k siga siendo válida [60, 84]:

$$\omega_0^2 = \frac{k}{m^*} \quad (2.24)$$

Para una micropalanca rectangular, $n = 0.249$.

Chen y Warmack [83] presentaron el primer modelo hidrodinámico unidimensional para la micropalanca inmersa en líquido. Consideraron la fuerzas inerciales y viscosas provocadas por una esfera de radio R oscilando en un líquido de densidad ρ y viscosidad η en el límite en el que $\text{Re} \gg 1$ (aproximación de flujo ideal):

$$m_{\text{eff}} = m^* + m'_{\text{esfera}} \Gamma'_{\text{esfera}} \approx nm + \frac{2}{3} \pi \rho R^3 \quad (2.25)$$

$$\gamma = n_1 \omega m'_{\text{esfera}} \Gamma''_{\text{esfera}} \approx 3\pi R^2 \sqrt{2\omega\eta\rho} \quad (2.26)$$

La función hidrodinámica de una esfera oscilando es una función ya conocida (véanse ecuaciones 2.17 y 2.18). Dado que las funciones hidrodinámicas de una esfera y de una placa rectangular son diferentes, es necesario introducir otro factor de corrección n_1 que varía con el tamaño y forma de la micropalanca considerada [85]. Los factores R y n_1 son invariantes para cada micropalanca y son ajustados después de hacer el experimento, por lo que la desventaja fundamental de este modelo es que no predice el comportamiento de la micropalanca. Su otro inconveniente es su ineficacia para reproducir modos de oscilación superiores, puesto que sólo existe un grado de libertad. Sin embargo, debido a su simplicidad, ha sido elegido por varios autores para describir de forma cualitativa sus resultados en relación a la vibración de la micropalanca de un AFM [86, 87, 88].

Modelo bidimensional

El modelo supone una placa de dos dimensiones con infinitos modos de vibración. La ecuación que rige movimiento de una placa cuyo eje longitudinal está en la dirección del eje x es la ecuación de Euler-Bernoulli [57]:

$$EI \frac{\partial^4 w(x, t)}{\partial x^4} + \mu \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial t^2} = f(x, t) \quad (2.27)$$

donde E , I , L y μ son el módulo de Young, el momento de inercia por unidad de área, la longitud y la masa por unidad de longitud de la micropalanca respectivamente y $f(x, t)$ la fuerza aplicada por unidad de longitud y $w(x, t)$ la deflexión de la micropalanca. Las fuerzas viscosas e inerciales están incluidas en el término $f(x, t)$ que incluye la contribución de las fuerzas hidrodinámicas por unidad de longitud.

La mayor parte de los modelos hidrodinámicos que consideran una micropalanca bidimensional suponen que el flujo es plano, esto es, que el fluido sólo se desplaza en planos yz verticales a la dirección x paralela al eje longitudinal de la micropalanca (véase figura 2.1a). Por este motivo estos modelos son válidos para órdenes bajos de la vibración de la micropalanca, ya que los modos altos implican también movimientos del fluido a lo largo del eje longitudinal de la micropalanca.

El primero de estos modelos [89] describe la micropalanca como una cadena de esferas de radio $b/2$, siendo b la anchura de la micropalanca. Las fuerzas viscosas y las inerciales son calculadas a través de la suma del efecto de estas fuerzas sobre $1/b$ esferas por unidad de longitud. De esta forma se introduce un término bidimensional en una ecuación bidimensional, por lo que no existe necesidad de considerar ningún factor de corrección.

O'Shea y Welland [90] utilizaron el mismo modelo para la fuerza viscosa. Sin embargo, recurrieron a la teoría de Greenspon [91] para obtener la masa inducida

por una placa rectangular vibrando en un fluido, ya que esto se ajusta mejor a la realidad. El modelo de esferas predice los valores de la fuerza inercial en exceso al tener en cuenta más masa desplazada por el fluido de la que realmente existe. La relación de dispersión entre la masa efectiva en agua y en aire que predice Greenspon toma la forma:

$$(m_{\text{eff}})_{\text{liq}} = nm + 0.6n\rho(L/b)^{3/2} \quad (2.28)$$

El segundo modelo describe la micropalanca como un cilindro y a partir de ellos predice el comportamiento de una placa rectangular. Fue desarrollado por John E. Sader y colaboradores a lo largo de varios trabajos [92, 93, 94, 95]. Este modelo se discutirá en la sección posterior por ser el más extendido y poder ser resuelto de forma semi-analítica. Además, en los últimos años se han desarrollado modelos válidos basados en éste para describir modos de vibración más altos [96, 97].

Modelo tridimensional

Sólo puede ser resuelto de forma numérica. Es válido para modos altos de vibración y muy útil para comparar con los modelos analíticos y semi-analíticos existentes [98]. Simula la interacción sólido-fluido en tres dimensiones mediante métodos de diferencias finitas. Para ello aplica como condiciones de contorno al problema del sólido las soluciones obtenidas del problema hidrodinámico de un fluido incompresible que se mueve de acuerdo a las ecuaciones de Navier Stokes. Los programas capaces de simular esto son bastante complejos y en los últimos años gozan de mucha popularidad, ya que a través de este método se superan las limitaciones de modelos analíticos (el número de dimensiones) y se ve de forma clara la física que subyace tras la disminución en Q y ω_0 al introducir la micropalanca en un medio líquido. Una de las principales ventajas es su capacidad para encontrar los lugares exactos en los que los mecanismos de disipación suceden, lo que es de gran utilidad para la fabricación de nuevos modelos de micropalancas con mayor factor de calidad (se puede variar la geometría de la micropalanca incluyendo agujeros, ensanchamientos...) y para la fabricación de celdas de fluidos con una respuesta efectiva mejor.

En relación al problema que nos interesa, Raman y colaboradores concluyen que modificar la geometría de la micropalanca puede incrementar el factor de calidad y la frecuencia de resonancia en el líquido [98]. En general, para maximizar los factores de calidad se debe maximizar la anchura de la micropalanca y minimizar la presencia de bordes y huecos, ya que éstos incrementan las tensiones. El modelo también demuestra que los modelos bidimensionales tienden a predecir la masa añadida en exceso y el factor de calidad en defecto debido a que predicen en exceso el valor de las presiones y sus correspondientes gradientes en el plano vertical al no permitir al líquido desplazarse en la dirección paralela al eje longitudinal de la micropalanca.

2.2.2. Método semi-analítico de Sader

Modos bajos de vibración

El método semi-analítico de Sader predice el comportamiento de una micropalanca oscilando en un fluido viscoso. Es importante comprender las hipótesis en las que se basa:

1. El flujo es **plano** (véase ecuación 2.9). El método supone que la longitud L de la micropalanca es mucho mayor que su anchura b ($L \gg b$). Esto permite aproximar la micropalanca por un cilindro de longitud infinita. La escala típica donde varía el campo de velocidades es por tanto una longitud incluida en el plano yz. En particular, la *escala típica* del problema de una micropalanca oscilando en un fluido es la anchura b de la micropalanca.
2. El flujo es **incompresible**. Se justifica porque la amplitud de las oscilaciones A (del orden de nm) es pequeña comparada con la escala típica del problema b (del orden de μm). A consecuencia de ello (véase ecuación 2.4) los efectos inerciales de la derivada convectiva no lineales son despreciables ($\vec{u} \cdot \vec{\nabla} \vec{u} \approx 0$) y la ecuación de Navier-Stokes (ecuación 2.1) se puede simplificar:

$$\rho \frac{\partial \vec{u}}{\partial t} = -\vec{\nabla} p + \vec{f}_{\text{hydro}} \quad (2.29)$$

3. La sección eficaz es constante a lo largo de la longitud de la micropalanca. Permite la definición de una función presión Γ que permitirá extraer la fuerza hidrodinámica.
4. La micropalanca es un sólido elástico en el que los efectos disipativos debidos a la fricción interna son despreciables frente a los debidos a la disipación en el medio.

La función hidrodinámica de un cilindro oscilante para un flujo plano e incompresible es conocida [81] (véanse ecuaciones 2.19 y 2.20). A partir de la ecuación 2.15 se observa que la transformada de Fourier de la fuerza hidrodinámica por unidad de volumen \hat{f}_{hydro} sobre un cilindro de radio $R = b/2$ viene dada por:

$$\hat{f}_{\text{hydro}} = \frac{\pi \rho b^2 \omega^2}{4} (\Gamma' + i\Gamma'') \hat{W}(x|\omega) \quad (2.30)$$

donde $\hat{W}(x|\omega)$ es la transformada de Fourier de la deflexión $W(x|t)$ de la micropalanca:

$$\hat{W}(x|\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} W(x|t) e^{-i\omega t} dt \quad (2.31)$$

La fuerza total por unidad de longitud f que actúa sobre la micropalanca es la suma de la fuerza por unidad de longitud debida a las fuerzas hidrodinámicas

f_{hydro} y de la fuerza de excitación por unidad de longitud f_{drive} . Haciendo la variable espacial x adimensional en la ecuación 2.27, multiplicando dicha ecuación por $e^{-i\omega t}$ e integrando en el tiempo desde $-\infty$ hasta $+\infty$, la ecuación de Euler-Bernoulli en el espacio de frecuencias toma la forma:

$$\frac{EI}{L^4} \frac{\partial^4 \hat{W}(x|\omega)}{\partial x^4} - \mu\omega^2 \hat{W}(x|\omega) = \hat{f}_{\text{hydro}}(x|\omega) + \hat{f}_{\text{drive}}(x|\omega) \quad (2.32)$$

$$\frac{\partial^4 \hat{W}(x|\omega)}{\partial x^4} - \frac{\mu\omega^2 L^4}{EI} \left(1 + \frac{\pi\rho b^2}{4\mu} \Gamma(\omega) \right) \hat{W}(x|\omega) = \hat{s}(x|\omega) \quad (2.33)$$

donde $\hat{f}_{\text{hydro}}(x|\omega)$ y $\hat{f}_{\text{drive}}(x|\omega)$ son las transformadas de Fourier de la fuerza hidrodinámica y de la fuerza de excitación y $\hat{s}(x|\omega)$ está relacionada con $\hat{f}_{\text{drive}}(x|\omega)$ mediante:

$$\hat{s}(x|\omega) = \frac{L^4}{EI} \hat{f}_{\text{drive}}(x|\omega) \quad (2.34)$$

Utilizando la teoría de funciones de Green [99], todo se reduce a calcular el propagador $G(x, x'|\omega)$ y $\hat{W}(x|\omega)$:

$$\hat{W}(x|\omega) = \int_0^1 G(x, x'|\omega) \hat{s}(x'|\omega) dx' \quad (2.35)$$

Para ello se debe hallar la solución a la ecuación 2.36 imponiendo las condiciones de contorno correspondientes a una barra fija por un extremo y libre por el otro, y las condiciones de continuidad.

$$\frac{\partial^4 G(x, x'|\omega)}{\partial x^4} - B^4(\omega) G(x, x'|\omega) = \delta(x - x') \quad (2.36)$$

donde:

$$B(\omega) = L\sqrt{\omega} \left(\frac{\mu}{EI} \right)^{1/4} \left(1 + \frac{\pi\rho b^2}{4\mu} \Gamma(\omega) \right)^{1/4} \quad (2.37)$$

Para el caso de excitación térmica, la función excitación no depende de la posición ($\hat{s}(x'|\omega) = \hat{s}(\omega)$) y se tiene:

$$\hat{W}(x|\omega) = \hat{s}(\omega) \int_0^1 G(x, x'|\omega) dx' = \frac{\hat{s}(\omega) EI}{L^4} \hat{W}_0(x|\omega) \quad (2.38)$$

donde $\hat{W}_0(x|\omega)$ es la función de transferencia correspondiente a una fuerza de excitación uniforme a lo largo de la longitud $f_{\text{drive},0} = 1$.

Por otra parte, se tiene que $\hat{W}(x|\omega)$ se puede desarrollar en autofunciones de ω y x :

$$\hat{W}(x|\omega) = \sum_{n=1}^{\infty} \hat{f}_{n,\text{drive}}(\omega) \alpha_n(\omega) \phi_n(x) \quad (2.39)$$

$$\alpha_n(\omega) = \int_0^1 \hat{W}_0(x|\omega) \phi_n(x) dx = \sum_{n=1}^{\infty} \beta_n(\omega) \phi_n(x) \quad (2.40)$$

El teorema de equipartición afirma que el valor esperado de la energía potencial de cada modo $U_n(t)$ ha de ser igual al valor de la energía térmica $U_{th,n} = k_B T/2$, siendo k_B la constante de Boltzmann y T la temperatura absoluta.

El valor esperado de la energía potencial de cada modo $U_n(t)$ se puede calcular:

$$U_n(t) = \frac{1}{2} \frac{EI}{L^3} \beta_n^2 \int_0^1 \left(\frac{d^2 \phi_n(x)}{dx^2} \right)^2 dx \quad (2.41)$$

y de esta forma se puede obtener el valor de la constante β_n necesario para hallar $\hat{W}_n(x|\omega)$:

$$|\hat{f}_n(\omega)|^2 = \frac{3\pi k_B T}{k c_n \int_0^\infty |\alpha(\omega')|^2 d\omega'} \quad (2.42)$$

$$|\hat{W}_n(x|\omega)|^2 = \frac{3\pi k_B T}{k} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{|\alpha_n(\omega')|^2}{c_n^4 \int_0^\infty |\alpha_n(\omega')|^2 d\omega'} \phi_n^2 \quad (2.43)$$

donde c_n son las raíces de la ecuación $1 + \cos c_n + \cosh c_n = 0$ que define los modos normales de vibración de una barra. Sader utiliza dos números adimensionales para separar las contribuciones a Q y ω_0 de fuerzas inerciales y disipativas de una manera muy elegante.

$$\text{Re} = \frac{\omega b^2 \rho}{4\eta} \quad (2.44)$$

$$\bar{T} = \frac{\rho b}{\rho_c h} \quad (2.45)$$

Como se mencionó anteriormente, Re indica la importancia relativa entre las fuerzas inerciales y las viscosas. El parámetro \bar{T} expresa el cociente entre la masa efectiva con respecto a la masa total de la micropalanca, y es utilizado para distinguir la inmersión de la micropalanca en líquidos y en gases. Fijando \bar{T} y estudiando el comportamiento de las magnitudes cuando Re se puede estudiar la importancia de las fuerzas viscosas respecto a las inerciales dependiendo del medio en el que la micropalanca esté inmersa. Además, disminuir Re en estas condiciones corresponde a reducir las dimensiones de la micropalanca. A partir de esto extraen conclusiones importantes.

Cuando la disipación viscosa es pequeña, la respuesta en frecuencia se puede aproximar por la de un oscilador armónico y viene descrita por:

$$\frac{\omega_{R,n}}{\omega_{vac,n}} = \left(1 + \frac{\pi \rho b}{4 \rho_c h} \Gamma'(\omega_{R,n}) \right)^{-1/2} \quad (2.46)$$

$$Q_n = \frac{\frac{4\mu}{\pi \rho b^2} + \Gamma'(\omega_{R,n})}{\Gamma''(\omega_{R,n})} \quad (2.47)$$

donde $\omega_{R,n}$ y $\omega_{vac,n}$ son la frecuencia de resonancia en ausencia de disipación y en el vacío respectivamente.

Si queremos estudiar una micropalanca rectangular debemos considerar un factor de corrección ($\Gamma_{rect} = \Omega_{rect} \Gamma_{circ}$) que Sader [92]. La aproximación semi-analítica para la función hidrodinámica Γ en el rango de frecuencias típico de un experimento de microscopía de fuerzas para una micropalanca rectangular viene dada por:

$$\Gamma' = a_1 + a_2 \frac{\Delta}{b} \quad (2.48)$$

$$\Gamma'' = b_1 \frac{\Delta}{b} + b_2 \left(\frac{\Delta}{b} \right)^2 \quad (2.49)$$

donde $\Delta = \sqrt{\frac{2\eta}{\rho\omega}}$ es el espesor de la capa límite, $a_1 = 1.0553$, $a_2 = 0.7997$, $b_1 = 3.8018$, y $b_2 = 2.7364$.

Sader toma como referencia la ecuación 2.46 con $\Gamma' = 1$ (modelo para flujos sin fricción) para separar los efectos en el cambio en frecuencia de resonancia debidos a fuerzas inerciales de los debidos a fuerzas viscosas. Las conclusiones principales de su trabajo son que el ensanchamiento del pico es principalmente debido a los efectos viscosos, mientras que el cambio en la frecuencia de resonancia es principalmente debido a las fuerzas inerciales. Además, la disipación viscosa se incrementa para micropalancas pequeñas (véase ecuación 2.44).

Maali y colaboradores [100] demostraron que había errores en la estimación de fuerzas disipativas e inerciales usando el modelo semi-analítico de Sader si se consideraban modos superiores.

Modos altos de vibración

Para el estudio de este caso, Sader y Van Eysden [95, 96] proponen otro número adimensional que da cuenta de la importancia del flujo tridimensional inducido a lo largo de la micropalanca. Viene dado por:

$$\kappa = c_1 \frac{b}{L} \quad (2.50)$$

Cuando $\kappa \rightarrow 0$, $\Gamma^f(\omega, n) = \Gamma(\omega)$ y se recuperan las soluciones obtenidas con los modelos que suponían un flujo bidimensional. En el límite de $\kappa \rightarrow \infty$ se tiene que:

$$\Gamma^f(\omega, n) = \frac{8}{\pi\kappa} \frac{\sqrt{\kappa^2 - i\text{Re}}}{\sqrt{\kappa^2 - i\text{Re}} - \kappa} \quad (2.51)$$

Además, demuestra que su modelo de flujo bidimensional es siempre válido para $n = 1$ y que el hecho de incrementar la proporción dimensional de la micropalanca afecta más al cambio de frecuencias de resonancia en aire que en líquido.

2.2.3. Comportamiento no simétrico de la fuerza hidrodinámica

Se observa experimentalmente que la compresión de una capa delgada del líquido (véase figura 2.1b) produce una disminución de Q y ω_0 a medida que la micropalanca se acerca a la muestra. La causa principal por la que esto ocurre es que más fracción del líquido entre la micropalanca y la muestra forma parte de la capa límite, haciendo que los efectos disipativos sean más altos. Los modos torsionales, cuyas frecuencias de resonancia son mayores, se ven menos afectados porque su correspondiente capa límite es más estrecha ($\Delta \prec 1/\sqrt{\omega}$).

Fuerzas viscosas

Varios autores [83, 89, 101, 102] modelan el comportamiento de las fuerzas viscosas con la distancia de separación h entre micropalanca y superficie y obtienen una dependencia de $1/h^3$ para una micropalanca rectangular. Por ejemplo, utilizando el modelo de la cadena de esferas se tiene que:

$$\gamma_h = \eta \frac{b^3 L}{h^3} \quad (2.52)$$

$$(2.53)$$

Existe una expresión analítica cuando $\text{Re} \ll 1$ y $h \ll b$ utilizando la teoría de lubricación de Reynolds [93] que postula la misma dependencia con el cociente b/h :

$$\Gamma^h(\omega) = \frac{i}{\pi} \left(\frac{b}{h} \right)^3 \frac{1}{\text{Re}} \quad (2.54)$$

Estas fuerzas son causadas por la micropalanca que comprime el fluido al acercarse. Sin embargo, existen otras fuerzas cuyo origen también es el confinamiento del líquido. Estas fuerzas son debidas a la contribución de la punta (véase esquema de la figura 2.1b). Sólo aparecen muy cerca de la superficie ($h < 1 \text{ nm}$) o cuando los cambios locales de la viscosidad son grandes. Esto podría ocurrir debido a efectos de confinamiento a nivel molecular como por ejemplo, lo que estudiaremos en el capítulo 6 [103].

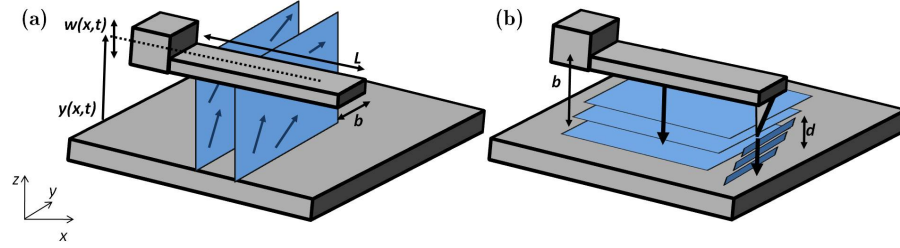


Figura 2.1: (a) El modelo de Sader supone una barra infinita en la que el movimiento del fluido está confinado en planos paralelos a la dirección del eje longitudinal de la barra. (b) Cuando la micropalanca se acerca a la muestra las fuerzas hidrodinámicas cambian; este cambio es apreciable cuando la distancia entre la micropalanca y la muestra es del orden de la anchura de la micropalanca b .

Experimentalmente, parece que la fuerza no decae tan rápidamente como $1/h^3$ [104]. Actualmente, hay pocos grupos que realicen simulaciones en líquidos y los existentes no suelen introducir este término, por lo que este campo permanece todavía abierto a modificaciones y a la espera de más medidas experimentales.

Fuerzas inerciales

El único método que introduce semi-analíticamente la dependencia de las fuerzas inerciales con la distancia fue también desarrollado por Sader y colaboradores, quienes extendieron su teoría para micropalancas rectangulares inmersas en líquidos a la presencia de una superficie [94].

Para estudiar este caso, es útil definir otro parámetro adimensional \bar{H} , o el cociente entre la separación entre la micropalanca y la superficie h_0 y la anchura de la micropalanca:

$$\bar{H} = \frac{h_0}{b} \quad (2.55)$$

La diferencia principal en el desarrollo matemático es que en este caso no existe una función de Green para la ecuación de Stokes en un fluido semi-infinito. Por ello Sader y Green dividen la micropalanca y la superficie en segmentos y formulan un sistema de ecuaciones matriciales. Todas pueden resolverse analíticamente excepto dos. Su principal conclusión es que la disminución en la frecuencia de resonancia a medida que la distancia entre la punta y la muestra se reduce es debido a las fuerzas viscosas. La masa desplazada por el fluido (m') y consecuentemente, las fuerzas inerciales, se ven débilmente afectadas por el acercamiento del sólido a la superficie; sin embargo, más parte del líquido que se mueve con la micropalanca se ve afectado por la capa límite y cuesta más trabajo moverlo, provocando así una disminución en ω_0 .

El modelo tridimensional de Raman y colaboradores también reproduce la disminución en Q y ω_0 cuando la micropalanca se aproxima a una superficie [98].

Una de sus conclusiones más importantes es que orientar la micropalanca a un ángulo próximo a la superficie incrementa los factores de calidad y las frecuencias de resonancia.

2.3. Excitación de la micropalanca

La forma en la que se excita la micropalanca en líquidos influye de manera decisiva en su comportamiento dinámico. No en vano ha habido múltiples trabajos teóricos y experimentales en relación a métodos de excitación [90, 100, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113]

El método más común es el llamado mecánico o acústico [105, 106]. La micropalanca es excitada por un piezoeléctrico que oscila a la frecuencia de resonancia de la micropalanca. Al ser el más extendido para excitar la micropalanca en aire, también se intentó aplicar este método para excitarla en líquidos. Sin embargo, la respuesta a la que da lugar es muy compleja. Aparecen muchos picos que no corresponden a resonancias de la micropalanca, lo que se conoce comúnmente como bosque de picos [100, 107] (véase figura 2.2a). Estos picos espúreos pueden corresponder a las vibraciones del líquido que mueven la micropalanca, a resonancias de la celda líquida o a resonancias del piezoeléctrico. En estas condiciones, es difícil de estimar la frecuencia de resonancia de la micropalanca y se tiene que recurrir a espectros de ruido térmico (véase figura 2.2b). Esto consiste en registrar la oscilación temporal de una micropalanca cuando la fuerza de excitación externa es cero, y mediante una transformada de Fourier, hallar las frecuencias de resonancia correspondientes a cada uno de los modos de oscilación. Algunos de los picos espúreos que aparecen utilizando la excitación acústica y una celda comercial también pueden ser utilizados para tomar una imagen, si bien no en las condiciones óptimas [106]. Shaffer y colaboradores [107] postularon que el complejo espectro de la micropalanca es la convolución entre el espectro de ruido térmico y el del líquido dentro de la celda.

Por esta razón, se investigó la posibilidad de excitar la micropalanca de una manera alternativa tal que no aparecieran resonancias espúreas. El más común entre éstos métodos es la excitación magnética [90, 108], que consiste en hacer oscilar una micropalanca recubierta de material magnético aplicando un campo magnético oscilante (véase figura 2.3). Las micropalancas han de estar recubiertas de material magnético, lo que hace el radio de la punta más grande. Además, el material magnético se corroe fácilmente en el medio líquido y es más costoso económicamente. La excitación magnética da lugar a curvas de resonancia en agua en las que los picos corresponden a las resonancias reales de la micropalanca. Existen otros métodos que también dan lugar a estas curvas. Por una parte, la excitación fototérmica [110], que consiste en utilizar un láser para calentar y enfriar la micropalanca tal que ésta se extiende y comprime y de esta forma se genera una oscilación. Por otra parte, la magnetostricción, donde un campo magnético oscilante contrae y expande la capa magnetostriictiva de la micropalanca haciéndola vibrar [111]. También es posible

modificar la micropalanca para que circule por ella una corriente alterna que, junto a un campo magnético aplicado, induce una fuerza que la hace oscilar [112].

Este capítulo se centra en la comparación entre excitación acústica y magnética, por ser los dos métodos más extendidos en la microscopía de fuerzas. Se ha asumido que ambos métodos pueden ser descritos por la misma ecuación de movimiento, aunque Lantz y colaboradores [109] ya postularon la expresión correcta para una micropalanca excitada en la base. Este error ha venido reforzado por el hecho de que en aire tanto experimentos como teoría y simulaciones coincidían en gran medida (véase figura 2.3). Recientemente, algunos experimentos y simulaciones apuntaron la existencia de diferencias en el comportamiento en líquidos dependiendo del método de excitación. Volkov investigó el comportamiento de una micropalanca excitada por el movimiento del líquido en una medida libre de resonancias de la celda [113], mientras que Legleiter y colaboradores escribieron las ecuaciones del movimiento en función del observable correcto [87]. Antes de pasar al tema principal, presentaré una introducción a la importancia del pico de resonancia en las medidas realizadas con el microscopio de fuerzas en líquidos.

2.3.1. Importancia del pico de resonancia

El pico de resonancia es el primer factor a optimizar a la hora de hacer una medida mediante AFM. Por una parte, para ser capaces de obtener propiedades cuantitativas de una propiedad nanomecánica es necesario describir correctamente la oscilación, cualquiera que ésta sea. Esto significa que en el caso en el que el bosque de picos esté presente, deberíamos incluir también su efecto al escribir las ecuaciones del movimiento. Por ello es bastante recomendable modificar la celda de líquidos o excitar la micropalanca utilizando otro método (por ejemplo, magnéticamente) de forma que sea más sencillo modelar la oscilación. Además, la optimización del pico de resonancia también es fundamental para la mejora en la adquisición de imágenes de AFM en líquidos. Si bien es cierto que se puede tomar una imagen en un pico espúreo, si éste no corresponde al de resonancia la medida será menos sensible y menos estable. La medida será menos sensible porque la disminución en la amplitud no estará vinculada exclusivamente a cambios en la fuerza de interacción punta-muestra, sino también a cambios en el comportamiento hidrodinámico del fluido que rodea la micropalanca. Esto es muy importante a la hora de tomar imágenes de biomoléculas, donde un pequeño cambio en la fuerza puede llegar a destruirlas. Además, la medida será menos estable porque las inestabilidades en el flujo y posibles burbujas influirán más en la dinámica debido a que el pico está directamente relacionado con resonancias de la celda o del fluido dentro de la celda.

2.3.2. Excitación magnética y excitación acústica pura.

En esta sección expondré la diferencia entre excitar la micropalanca en la punta y excitarla en la base. Excitarla en la punta es lo que hacemos cuando excitamos la

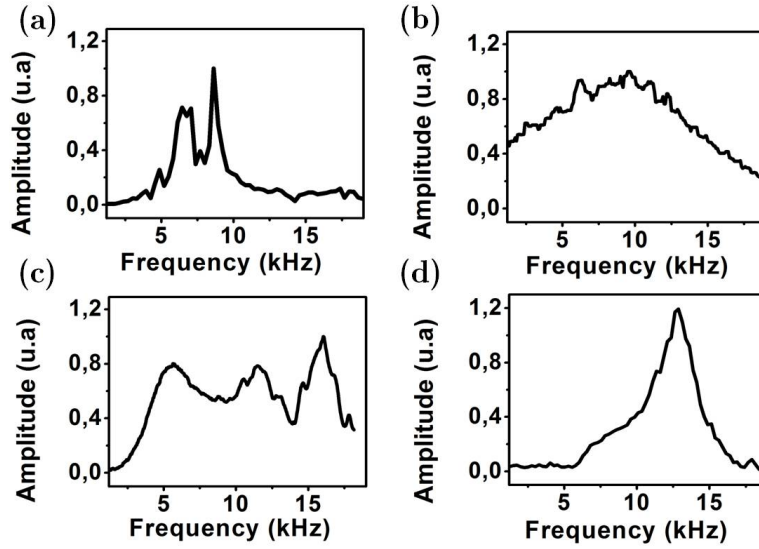


Figura 2.2: Espectros correspondientes a una micropalanca de $k = 0.2 \text{ N/m}$ y $f_0 \approx 9 \text{ kHz}$ en líquidos excitada (a) acústicamente en celda sin modificar, (b) con ruido térmico, (c) acústicamente en celda modificada y (d) acústicamente en celda de fluidos optimizada de un microscopio comercial.

micropalanca magnéticamente, ya que la base no se mueve. Excitarla en la base es lo que hacemos normalmente cuando utilizamos excitación acústica en aire: el piezo está justo debajo del chip de la micropalanca y una oscilación en la base da lugar a una oscilación en la punta. Para implementar esta excitación en líquidos se ha utilizado una celda modificada [100] que anteriormente había sido construida en el laboratorio. De esta forma el piezoeléctrico, en lugar de estar situado en medio de la celda provocando la vibración de la celda completa como en la celda de fluidos más popular (véase figura 2.2a), está situado debajo del chip. Para ello es necesario incluir un vidrio entre el chip y el piezoeléctrico para aislar el piezoeléctrico del contacto con el líquido y permitir la formación de un menisco de líquido entre la muestra y el vidrio que constituye lo que se denomina celda de líquidos abierta. De esta forma, el piezoeléctrico hace oscilar únicamente la micropalanca desde su base y la respuesta en frecuencias se simplifica ostensiblemente (véase la figura 2.2c). Existen microscopios comerciales que han mejorado su celda de fluidos colocando el piezoeléctrico justo debajo de la micropalanca y simplifican las medidas en líquidos de forma notable (véase figura 2.2d). Es necesario puntualizar que la vibración de la micropalanca en la celda modificada no corresponde exactamente a la excitación de la micropalanca en la base, aunque como primera aproximación es buena. Para hacer el estudio de forma más estricta es necesario incluir el hecho de que la excitación acústica de la micropalanca es provocada, además de por la oscilación de la base, por el movimiento del fluido que la rodea [114]. A lo largo de las siguientes secciones, consideraré la excitación mecánica ideal (excitación provocada por una oscilación de

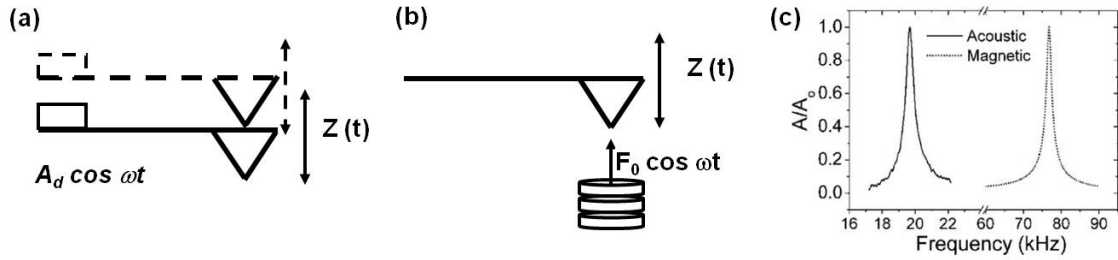


Figura 2.3: (a) La micropalanca se excita acústicamente en su base y (b) la micropalanca se excita magnéticamente en su punta. Correspondientes curvas de resonancia en aire para una micropalanca de $k = 0.2$ N/m excitada acústicamente y una micropalanca de $k = 0.75$ N/m excitada magnéticamente.

la base) y la excitación magnética en el desarrollo teórico.

2.3.2.1. Modelo unidimensional

¿Cuál es el observable?

Para escribir la ecuación que rige el movimiento de forma correcta es necesario determinar cuál es el observable, porque será a partir de éste que obtendremos la amplitud y fase de la oscilación. En 1999, Lantz y colaboradores [109] proporcionaron evidencia experimental de que la deflexión de la micropalanca es el observable que se mide. Comprobaron experimentalmente que cuando la punta de una micropalanca excitada acústicamente contacta con la muestra hay una señal residual que sólo puede ser debida a que lo que el fotodiodo registra son cambios en la pendiente de la micropalanca (deflexión) y no en la posición de la punta. Sin embargo, dicha señal residual es cero si la micropalanca es excitada magnéticamente. Dado que el sistema de detección es el mismo que en el caso anterior, y por tanto debería ser sensible a la deflexión, esto implicaría que en el caso de una micropalanca excitada magnéticamente *la base no se mueve* (véase figura 2.4).

Por esta razón escribiré las ecuaciones del movimiento en función del observable deflexión $z(t)$. Antes me gustaría hacer unas pequeñas reflexiones en relación a los motivos por los que el observable es la deflexión de la micropalanca. El fotodiodo es un dispositivo que registra *posiciones* del haz de láser incidente. Los cambios de estas posiciones pueden tener dos orígenes diferentes: pueden ser debidos a cambios en la pendiente de la micropalanca o a cambios debidos a desplazamientos verticales de la micropalanca sin cambio de pendiente. El observable es la pendiente, esto es, la deflexión de la micropalanca, porque los desplazamientos puramente verticales (véase figura 2.5a) resultan en una señal del fotodiodo muchísimo más baja que los debidos a cambios en la pendiente (véase figura 2.5b). Si α es el ángulo de incidencia del rayo, γ es el ángulo de deflexión, h el consecuente desplazamiento en la posición vertical de la punta y d es la distancia de separación entre la base de la micropalanca y el fotodiodo:

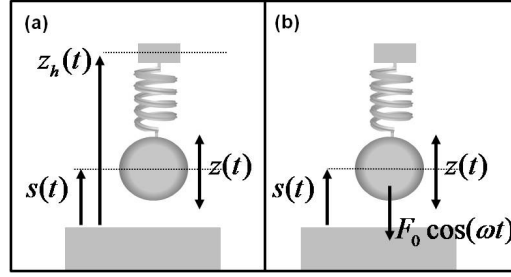


Figura 2.4: Esquema del modelo de masa puntual. $z_h(t)$ es la posición de la base de la micropalanca, $s(t)$ es la posición de la punta de la micropalanca y $z(t)$ es la deflexión de la micropalanca ($z(t) = s(t) - z_h(t)$). La micropalanca es excitada (a) debido a una oscilación de la base $z_h(t)$ y (b) debido a una fuerza aplicada $F_0 \cos \omega t$ en su punta.

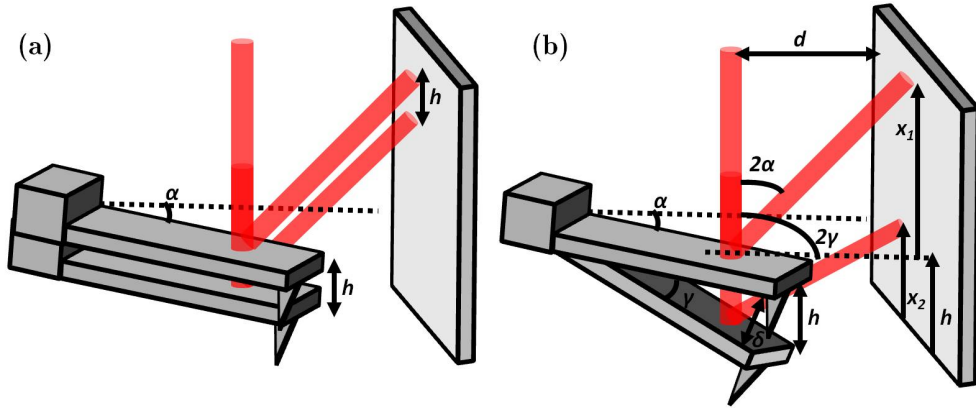


Figura 2.5: Esquema de lo registrado en el fotodiodo debido a (a) desplazamientos verticales puros y (b) cambios en la pendiente de la micropalanca inclinada un ángulo α con respecto a la superficie.

$$x_1 = \frac{d}{\tan 2\alpha} \quad (2.56)$$

$$x_2 = \frac{d}{\tan(2\alpha + 2\gamma)} \quad (2.57)$$

$$\gamma = \arctan\left(\frac{\delta}{L}\right) \quad (2.58)$$

$$\delta = h \cos(\gamma + \alpha) \quad (2.59)$$

En el caso de que la micropalanca se desplace verticalmente con respecto al origen una distancia h , el desplazamiento medido en el fotodiodo vendría dado por:

$$\Delta x = x_1 - x_2 = h \quad (2.60)$$

Sin embargo, en el caso en el que la micropalanca cambie su pendiente:

$$\Delta x = x_1 + h - x_2 \quad (2.61)$$

En la figura 2.6 se pueden ver los resultados obtenidos para las longitudes características de nuestro sistema experimental, como por ejemplo, $L = 247 \mu\text{m}$, $\delta = 25 \text{ nm}$ y $d = 2 \text{ cm}$. Para ángulos de inclinación de la micropalanca que varían entre 10 y 15° la señal resultante debida a un cambio de pendiente es mucho mayor que la resultante debida a un desplazamiento vertical puro. Por ello, es correcto decir que el fotodiodo registra principalmente variaciones en la pendiente de la micropalanca.

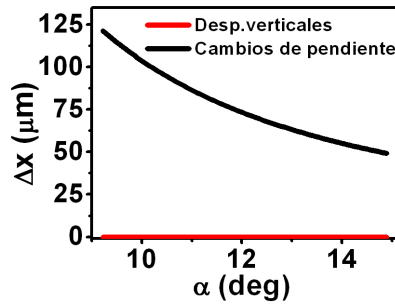


Figura 2.6: Señal medida en el fotodiodo Δx frente a ángulo de inclinación α de una micropalanca de $L = 247 \mu\text{m}$ separada 2 cm del fotodiodo.

Ecuación del movimiento para una micropalanca excitada en la punta

Si se aplica una fuerza $F_0 \cos(\omega t)$ en la punta y la base está fija ($z_h(t) = 0$), la ecuación que rige el movimiento en función del observable posición $s(t)$ de la micropalanca con respecto a la superficie (véase figura 2.4) viene dada por:

$$m_{\text{eff}}\ddot{s}(t) + \gamma\dot{s}(t) + k(s(t) - z_h(t)) = F_0 \cos \omega t \quad (2.62)$$

siendo $\gamma = \frac{m_{\text{eff}}\omega_0}{Q}$.

Es necesario escribir la ecuación en función del observable deflexión $z(t)$ ($z(t) = s(t) - z_h(t)$):

$$m_{\text{eff}}\ddot{z}(t) + \gamma\dot{z}(t) + kz(t) = F_0 \cos \omega t \quad (2.63)$$

Suponiendo que la deflexión es una señal armónica ($z(t) = A \cos(\omega t + \phi)$), multiplicando por $\sin(\omega t + \phi)$ y $\cos(\omega t + \phi)$ respectivamente e integrando en un periodo de oscilación se obtienen dos ecuaciones con dos incógnitas (A y ϕ). Despejando la amplitud tenemos:

$$A(\omega) = \frac{F_0 \omega_0^2}{k \sqrt{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + \left(\frac{\omega \omega_0^2 \gamma}{k}\right)^2}} \quad (2.64)$$

Ecuación del movimiento para una micropalanca excitada en la base

Si se aplica una fuerza F_0 en la base, de tal forma que ésta oscila con una amplitud F_0/k , el movimiento de la base viene dado por $z_h(t) = \frac{F_0}{k} \cos \omega t$. La ecuación que rige el movimiento en función del observable posición es:

$$m_{\text{eff}} \ddot{s}(t) + \gamma \dot{s}(t) + k(s(t) - z_h(t)) = 0 \quad (2.65)$$

La ecuación que rige el movimiento en función del observable deflexión es en este caso:

$$m_{\text{eff}} \ddot{z}(t) + \gamma \dot{z}(t) + kz(t) = F_0 \cos \omega t + \frac{\gamma F_0 \omega_0}{k} \sin \omega t \quad (2.66)$$

Suponiendo que la deflexión es una señal armónica ($z(t) = A \cos(\omega t + \phi)$), multiplicando por $\sin(\omega t + \phi)$ y $\cos(\omega t + \phi)$ respectivamente e integrando en un periodo de oscilación se obtienen dos ecuaciones con dos incógnitas (A y ϕ). Despejando la amplitud se obtiene la expresión [86]:

$$A(\omega) = \frac{F_0}{k} \frac{\sqrt{\omega^4 + \left(\frac{\omega \omega_0^2 \gamma}{k}\right)^2}}{\sqrt{(\omega^2 - \omega_0^2)^2 + \left(\frac{\omega \omega_0^2 \gamma}{k}\right)^2}} \quad (2.67)$$

Ajustes a las curvas experimentales

Hemos ajustado las curvas experimentales obtenidas en agua utilizando excitación magnética y utilizando excitación acústica con la celda modificada a las expresiones analíticas 2.64 y 2.67. Ambos ajustes son muy buenos. Para la excitación magnética, la bondad del ajuste es de $R^2 = 0.96$ y los valores obtenidos son $Q = 3.49 \pm 0.04$ y $\omega_0 = 24.26 \pm 0.04$ kHz. Para la excitación acústica el ajuste también es bueno ($R^2 = 0.96$) y los valores obtenidos para Q y ω_0 son $Q = 1.71 \pm 0.02$ y $\omega_0 = 5.29 \pm 0.02$ kHz.

En la figura 2.7a se presenta la respuesta en frecuencias de una micropalanca de constante de fuerzas $k = 0.75$ N/m excitada magnéticamente. A frecuencias bajas, la respuesta tiende a un valor finito (F_0/k), mientras que a frecuencias altas la amplitud se hace cero. Sin embargo, el comportamiento de una micropalanca de constante de fuerzas $k = 0.2$ N/m excitada en la base es cualitativamente muy distinto (véase figura 2.7b). A frecuencias bajas, la amplitud es cero, mientras que a frecuencias altas la amplitud tiende a un valor finito (F_0/k). En resonancia, las amplitudes correspondiente a ambas situaciones también difieren. Para la micropalanca excitada magnéticamente se obtiene:

$$A(\omega_0) = QF_0/k \quad (2.68)$$

Sin embargo, para la micropalanca excitada acústicamente se obtiene una dependencia diferente con el factor de calidad:

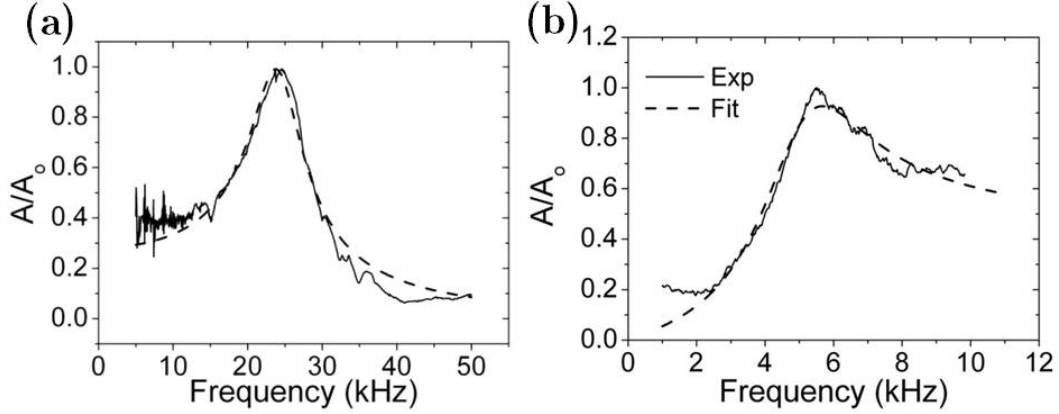


Figura 2.7: Amplitudes experimentales (línea continua) y ajuste (línea discontinua) frente a frecuencia para una micropalanca excitada (a) magnéticamente y (b) acústicamente.

$$A(\omega_0) = \frac{QF_0}{k} \left(1 + \frac{1}{Q^2}\right)^{1/2} \quad (2.69)$$

Las curvas experimentales fueron tomadas con micropalancas de constante de fuerzas pequeñas como las que normalmente se utilizan en líquidos. Es por ello que se observa una diferencia tan notable entre las curvas correspondientes a ambos métodos. Para estudiar el comportamiento de las curvas con k y Q se han utilizado simulaciones numéricas (véase la sección 3.3).

2.3.2.2. Modelo bidimensional

Al igual que para el modelo de masa puntual, es necesario escribir las ecuaciones en función del observable correcto. En el apartado 2.3.2.1 vimos que el observable es la pendiente en la punta $\frac{\partial s(x,t)}{\partial x}$, que se relaciona con la deflexión mediante:

$$\left. \frac{\partial s(x,t)}{\partial x} \right|_{x=1} = \left. \frac{\partial w(x,t)}{\partial x} \right|_{x=1} = \sum_k \phi'_k(1) Y_k(t) \quad (2.70)$$

Esto es, la derivada espacial de la posición de la punta es igual a la derivada espacial de la deflexión. De esta forma es posible hallar las soluciones para el observable resolviendo la ecuación de Eurler-Bernoulli para la deflexión de la micropalanca. Existen dos formas de solucionar este problema.

Fuerza incluida en las condiciones de contorno

La primera forma es hallar las soluciones de la ecuación de Euler-Bernoulli para la deflexión de la micropalanca e incluir la excitación en las condiciones de contorno. El modelo de Rayleigh [115] incluye las fuerzas disipativas como:

Exc. Magnética	Exc. Acústica
$y(0) = 0$	$y(0) = \frac{F_0}{k}$
$y_x(0) = 0$	$y_x(0) = 0$
$y_{xx}(1) = 0$	$y_{xx}(1) = 0$
$y_{xxx}(1) = \frac{F_0 L^3}{EI}$	$y_{xxx}(1) = 0$

Tabla 2.1: Condiciones de contorno para una micropalanca excitada magnética y acústicamente. En el caso de la excitada magnéticamente, la fuerza en la punta es igual a $\frac{F_0 L^3}{EI}$. En el caso de la excitada acústicamente, la base oscila con una amplitud F_0/k .

$$f_{\text{hydro}} = a_1(\omega) L^4 \frac{\partial}{\partial t} \left(\frac{\partial^4 w(x, t)}{\partial x^4} \right) + c(\omega) L^4 \frac{\partial w(x, t)}{\partial t} \quad (2.71)$$

donde $a_1(\omega)$ y $C(\omega)$ son los coeficientes del término correspondiente al rozamiento interno y a la disipación en el medio

Si los efectos disipativos debidos a fricción interna son despreciables frente a los debidos a la disipación en el medio, la ecuación de Euler-Bernoulli (ecuación 2.27) toma la forma:

$$EI \frac{\partial^4 w(x, t)}{\partial x^4} + \mu L^4 \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial t^2} + c(\omega) L^4 \frac{\partial w(x, t)}{\partial t} = 0 \quad (2.72)$$

Suponiendo $w(x, t) = y(x) e^{-i\omega t}$ se tiene que:

$$EI \frac{\partial^4 y(x)}{\partial x^4} - (\mu L^4 \omega^2 + ic(\omega) L^4) y(x) = EI \frac{\partial^4 y(x)}{\partial x^4} - \alpha^4(\omega) y(x) = 0 \quad (2.73)$$

Las soluciones de esta ecuación son de la forma:

$$y(x) = a_1 e^{\alpha(\omega)x} + a_2 e^{-\alpha(\omega)x} + a_3 \cos \alpha(\omega)x + a_4 \sin \alpha(\omega)x \quad (2.74)$$

Cuando la micropalanca es excitada magnéticamente se aplica una fuerza puntual en su extremo libre. Cuando es excitada acústicamente, se aplica un movimiento oscilatorio en su base que produce una oscilación en su extremo libre. Aplicando las condiciones de contorno adecuadas (véase tabla 2.1) para cada método de excitación es posible hallar la respuesta en el tiempo de la micropalanca a lo largo de su longitud.

La figura 2.8a muestra el comportamiento en el espacio y en el tiempo de una micropalanca de $k = 0.01$ N/m, $A_0 = 10$ nm, $f_0 = 16$ kHz y $Q = 2$ excitada magnéticamente. La figura muestra cómo oscila únicamente la punta de la micropalanca. Sin embargo, la micropalanca excitada en la base (figura 2.8b) muestra la oscilación de la base que da lugar a una oscilación desfasada en la punta. Si además calculamos

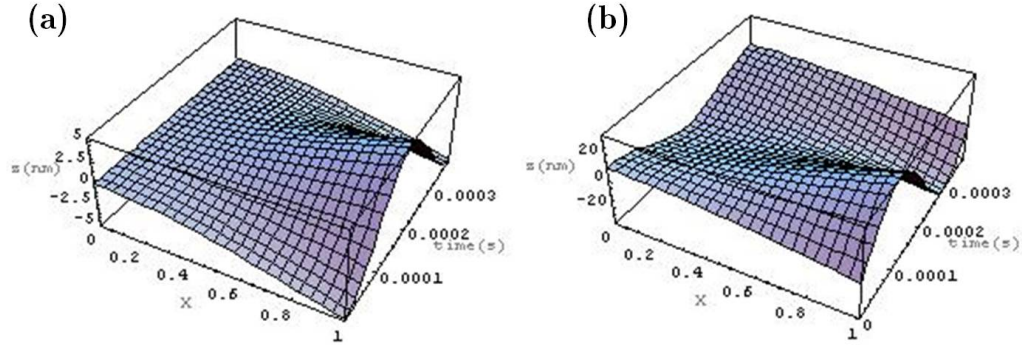


Figura 2.8: Solución a la ecuación del movimiento bidimensional en función del tiempo y de la posición en el eje longitudinal de una micropalanca de $f_0 = 16$ kHz, $k = 0.01$ N/m, $A_0 = 10$ nm y $Q = 2$ excitada (a) magnéticamente (en la punta) y (b) acústicamente (en la base).

amplitud y fase en función del observable correcto $w(x, t) = \frac{\partial s(x, t)}{\partial x} \prec s(x, t) - z_h(t)$ como en el apartado anterior, se obtienen las mismas curvas de resonancia que las que aparecían en la figura 2.7 utilizando el modelo unidimensional.

Fuerza incluida en la ecuación y condiciones de contorno nulas

La otra forma de operar es la que se ha implementado en las simulaciones. Consiste en incluir la fuerza de excitación en la ecuación del movimiento:

$$EI \frac{\partial^4 w(x, t)}{\partial x^4} + \mu L^4 \frac{\partial^2 w(x, t)}{\partial t^2} + c(\omega) L^4 \frac{\partial w}{\partial t} = \quad (2.75)$$

$$= \begin{cases} -L^4 f_{\text{exc}} \cos \omega t \delta(x - 1) & \text{Exc. Magnética} \\ -\mu L^4 \ddot{z}_h(t) - c(\omega) L^4 \dot{z}_h(t) & \text{Exc. Acústica} \end{cases} \quad (2.76)$$

siendo f_{exc} la fuerza magnética aplicada por unidad de longitud y $\dot{z}_h(t)$ y $\ddot{z}_h(t)$ la velocidad y aceleración de la base de la micropalanca en excitación acústica. Las condiciones de contorno son las correspondientes a una barra fija en uno de sus extremos y libre en el otro. Esto posibilita un desarrollo de $w(x, t)$ en función de los modos normales de oscilación $\phi_k(x)$ [116]:

$$w(x, t) = \sum_k \phi_k(x) Y_k(t) \quad (2.77)$$

Combinando las ecuaciones 2.75 y 2.76, multiplicando por $\phi_n(x)$, integrando a lo largo de la longitud de la micropalanca y utilizando las propiedades de ortogonalidad de los modos normales se obtiene una ecuación diferencial ordinaria para cada método de excitación:

$$\ddot{Y}_k(t) + \frac{C_k(\omega)}{M_k} \dot{Y}_k(t) + \omega_{0,k}^2 Y_k(t) = \quad (2.78)$$

$$= \begin{cases} \frac{f_{exc}}{\mu} \cos(\omega t) \phi_n(1) & \text{Exc. Magnética} \\ \left(-\frac{C_n(\omega) z_h(t)}{M_n} - \ddot{z}_h(t) \right) \int_0^1 \phi_k(x) dx & \text{Exc. Acústica} \end{cases} \quad (2.79)$$

donde

$$z_h(t) = \frac{F_0}{k} \cos(\omega t) \quad (2.80)$$

$$K_k = \frac{EI}{L^4} \int_0^1 \phi_{k,xxx}(x) \phi_n(x) dx \quad (2.81)$$

$$M_k = \int_0^1 \mu(x) \phi_k^2(x) dx = \mu \quad (2.82)$$

$$C_k = \int_0^1 c(x, \omega) \phi_n^2(x) dx = c(\omega) \quad (2.83)$$

$$\omega_{0,k}^2 = \frac{K_k}{M_k} = \frac{EI}{\mu} \frac{c_k^4}{L^4} \quad (2.84)$$

Como se mencionó anteriormente, la ventaja de este método es la simplificación que conlleva el haber operado con los modos normales de la micropalanca.

2.3.3. Simulaciones numéricas

Modelo teórico

Tanto el modelo unidimensional como el bidimensional han sido implementados en las simulaciones numéricas. Se da la posibilidad al usuario de poder elegir el factor de calidad o de calcularlo a través de los valores de densidad y viscosidad del medio. En el modelo unidimensional se ha utilizado el modelo hidrodinámico de Chen [83] que modela la micropalanca como una esfera e introduce un factor de corrección para dar cuenta de la diferencia en geometría. En el modelo bidimensional se ha considerado el modelo de cadena de esferas para la fuerza viscosa y el de Greenspon para la inercial [90]. Las ecuaciones del movimiento se han resuelto mediante un algoritmo Runge-Kutta de 4º orden [117].

Simulaciones numéricas

He simulado la dinámica de una micropalanca oscilando en aire y agua cuya longitud es de 200 μm , anchura de 38.82 μm y frecuencia de resonancia cuando no hay disipación de $f_{0,vac} = 19.86 \text{ kHz}$. Los valores utilizados para modelar ambos medios son $\rho_{air} = 1.18 \text{ kgm}^{-3}$, $\eta_{air} = 1.86 \cdot 10^{-5} \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $Q_{air} = 100$ y $\rho_{water} = 997 \text{ kgm}^{-3}$, $\eta_{wat} = 8.59 \cdot 10^{-4} \text{ kgm}^{-1}\text{s}^{-1}$ y $Q_{water} = 2$ respectivamente.

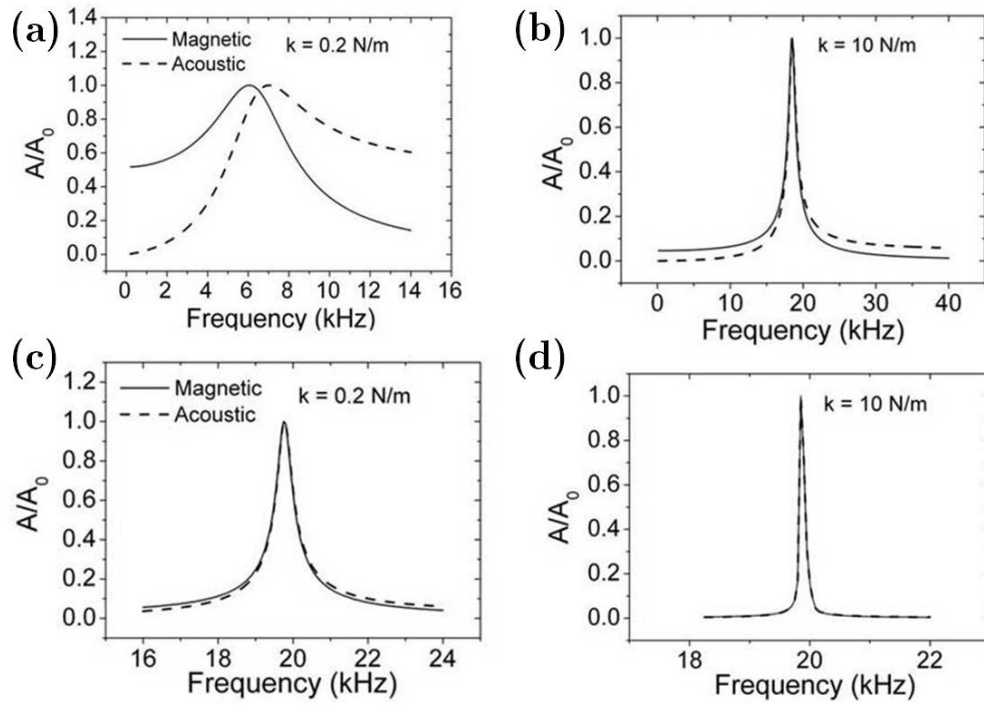


Figura 2.9: Curva de resonancia simulada para micropalancas de $k = 0.2 \text{ N/m}$ y $k = 10 \text{ N/m}$ oscilando a $f_0 \approx 20 \text{ kHz}$ en (a)-(b) agua ($Q = 4$) y (c)-(d) aire ($Q = 100$) bajo excitación magnética (línea continua) y bajo excitación acústica (línea discontinua).

Las curvas que aparecen en las figura 2.9a-b muestran el comportamiento de dos micropalancas de constante de fuerzas diferentes ($k = 0.2 \text{ N/m}$ y $k = 10 \text{ N/m}$) excitadas magnética y acústicamente en un medio de factor de calidad bajo. La amplitud de las curvas correspondientes a la excitación acústica es cero para frecuencias bajas y saturan a una constante para frecuencias más altas que la de resonancia, mientras que las correspondientes a excitación magnética tienen un comportamiento cualitativa y cuantitativamente distinto. Estas diferencias son bastante más apreciables para micropalancas de constante de fuerzas y factor de calidad pequeños ($k = 0.2 \text{ N/m}$ y $Q = 2$) (véase figura 2.9a). Además, se observa que la frecuencia a la que la amplitud es máxima es mayor para micropalancas excitadas acústicamente. Esto está de acuerdo a la expresión teórica dada por las ecuaciones 2.64 y 2.67.

Por otra parte, en las figuras 2.9c-d se observa que la respuesta en frecuencia es independiente del método de excitación en medios donde el factor de calidad es alto. Esto ocurre para $Q > 50$ e implica que los resultados experimentales obtenidos en aire no se verían afectados por el hecho de no utilizar el observable correcto. Esto es debido a que el movimiento de la base ($\frac{F_0}{k} = \frac{A_0}{Q}$) no es apreciable en aire. Para la misma amplitud libre, el factor de calidad Q puede ser de hasta 400 veces mayor en aire que en líquidos. Las simulaciones numéricas concuerdan con lo presentado en las expresiones analíticas (ecuaciones 2.64 y 2.67) y con lo observado en los experimentos (véase figura 2.7) [86].

2.4. Conclusiones

La dinámica de una micropalanca oscilando en un medio depende de las propiedades del medio en el que oscila. Por una parte, la densidad ρ del medio produce un aumento de las fuerzas inerciales que dan lugar a un incremento de la masa efectiva de la micropalanca m_{eff} y a una consecuente disminución de la frecuencia de resonancia de la micropalanca ω_0 . Por otra parte, estas fuerzas inerciales también contribuyen a la disminución del factor de calidad Q de la micropalanca, si bien la contribución principal a la disminución de Q es debido al efecto de la viscosidad η del medio.

Para modelar los efectos hidrodinámicos debidos a la inmersión de la micropalanca en un medio se han de derivar expresiones teóricas que relacionen ω_0 y Q con ρ y η . Se han estudiados varios de estos modelos dependiendo del número de dimensiones consideradas. En particular, se ha presentado las hipótesis y conclusiones fundamentales del modelo semi-analítico de Sader utilizado para calcular las fuerzas hidrodinámicas sobre una micropalanca rectangular vibrando en un fluido.

Para modelar el comportamiento de la micropalanca es necesario introducir las fuerzas hidrodinámicas en la ecuación del movimiento. La ecuación del movimiento depende del número de dimensiones consideradas. Se han presentado las ecuaciones del movimiento correspondientes al modelo unidimensional (o modelo de masa pun-

tual) y al modelo bidimensional (o modelo continuo). Se han escrito estas ecuaciones en función del observable correcto, esto es, de la deflexión de la micropalanca.

La dinámica de una micropalanca oscilando en un medio depende del modo de excitación utilizado. Se ha comparado la excitación en la base con la excitación en la punta de forma experimental, y también a través de expresiones teóricas y de simulaciones numéricas. Cuando las ecuaciones están escritas en función del observable correcto (deflexión), se observa una dependencia de la curva de resonancia de la micropalanca en el modo de excitación tanto utilizando el modelo de masa puntual como utilizando el modelo continuo. En medios con factor de calidad alto como el aire esta dependencia no se observa de forma experimental debido a que el valor de Q es alto y la base de la micropalanca no se mueve apreciablemente. Sin embargo, en medios con factor de calidad bajo como el agua, la diferencia entre una micropalanca excitada acústicamente y una micropalanca excitada magnéticamente es significativa tanto cualitativa como cuantitativamente, en particular cuando se utilizan micropalancas de baja constante de fuerzas $k < 1$ N/m.

Capítulo 3

La microscopía de fuerzas bimodal

3.1. Introducción

3.1.1. La microscopía de fuerzas multifrecuencia

La microscopía de fuerzas bimodal [118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128] se engloba dentro del marco de la microscopía de fuerzas multifrecuencia. La microscopía de fuerzas multifrecuencia toma su nombre de utilizar frecuencias alternativas a la de excitación para extraer información de la vibración de la micropalanca y consecuentemente de la muestra. Estas frecuencias pueden corresponder, bien a armónicos superiores de la frecuencia de oscilación (cuya frecuencia son múltiplos enteros de ω_{osc}) [87, 129, 130, 131], o bien a modos de vibración flexurales o torsionales superiores de frecuencia de resonancia ω_n [50, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 132]

La microscopía de fuerzas multifrecuencia basada en la excitación de armónicos superiores de la frecuencia de excitación encuentra su régimen óptimo de operación en régimen repulsivo en aire y en medio líquido, ya que en ellos la amplitud de los armónicos superiores es alta. El interés principal de estos armónicos superiores reside en su capacidad para la reconstrucción de la fuerza de interacción [87, 133], aunque también han sido utilizados para implementar una realimentación adicional que solucione los problemas de deriva en líquidos [130], o para tomar imágenes en canales auxiliares [129, 131]. Este tipo de microscopía de fuerzas multifrecuencia se verá en detalle en el capítulo 5.

La microscopía de fuerzas multifrecuencia engloba también métodos que no se basan en armónicos de la frecuencia de excitación, sino en modos más altos de oscilación. Como vimos en el capítulo anterior, una barra oscilante tiene infinitos modos de vibración ϕ_n , tanto flexurales como torsionales. Podemos excitarla a cualquiera de ellos, teniendo en cuenta que a medida que nos alejamos en el orden del modo, mayor será su correspondiente k_i y ω_{0i} [84]. Estos modos se pueden utilizar de formas muy diversas. Una de las más interesantes consiste en excitar la micropalanca en su segundo modo flexural para medir con una amplitud libre muy pequeña; el

hecho de que la constante de fuerzas de modos superiores sea más alta que la del fundamental evita que la micropalanca se quede pegada a la muestra por efecto de las fuerzas capilares [132]. Sin embargo, la excitación de la micropalanca a las frecuencias de resonancia correspondientes a estos modos de vibración también tiene sus inconvenientes. La constante de fuerzas k_i del modo i está relacionada con la sensibilidad del modo. La aparición de una fuerza de interacción produce un cambio en la frecuencia de resonancia de la micropalanca; para un cambio determinado de la frecuencia de resonancia, habrá menos variación de la amplitud y de la fase cuanto más ancho sea el pico de resonancia. La anchura del pico $\Delta\omega$ está determinada por:

$$\Delta\omega_i = \frac{\omega_{0,i}}{Q_i} \quad (3.1)$$

Cuanto mayor sea k_i mayor será $\omega_{0,i}$ (véase ecuación 2.24). Además, también aumentará Q_i [96]. Sin embargo, el aumento en k_i con el orden del modo i es menor que el aumento en Q_i , por lo que cuanto mayor sea el orden del modo más ancho será el pico de resonancia y menos sensible será el modo i de oscilación.

Otro ejemplo de microscopía de fuerzas multifrecuencia es la desarrollada por Sahin y colaboradores, quienes han utilizado modos torsionales y micropalancas modificadas para reconstruir la fuerza de interacción de una forma muy elegante [50] (véase capítulos 1 y 4).

3.1.2. La microscopía de fuerzas bimodal

La microscopía de fuerzas bimodal consiste en excitar la micropalanca a las frecuencias de resonancia de sus dos primeros modos flexurales de vibración (lo que se denomina excitación bimodal) [118]. En la microscopía de fuerzas convencional se excita únicamente un modo de vibración y se mide la respuesta de la micropalanca a la frecuencia correspondiente. De esta oscilación se extrae la amplitud y el desfase con respecto a la excitación (o el cambio en la frecuencia de resonancia de la micropalanca y la disipación si se opera en modulación en frecuencia). Esto es, existen dos canales para extraer información. Si se excita también un modo adicional, la micropalanca responde en las frecuencias correspondiente a los dos modos [118]. De esta forma los canales de los que se puede obtener información se duplican. Ahora es posible extraer la amplitud y la fase (o cambio en frecuencia de resonancia y disipación si se opera en modulación en frecuencia) correspondientes a ambos modos de vibración.

La importancia de la microscopía de fuerzas bimodal reside en estas variables adicionales. Muchos de los trabajos más representativos de la última época en cuanto a resolución atómica [32, 69, 134] se refiere (véanse la figura 1.3f de la página 9 y la figura 1.7 de la página 19), coinciden en que la resolución lateral se optimiza utilizando canales que no están sujetos a la realimentación. En el caso de la microscopía bimodal modulada en amplitud, estos canales son tres: fase del primer y segundo modo (ϕ_1 y ϕ_2) y amplitud del segundo modo (A_2).

La dinámica del microscopio resulta en este caso más compleja, pero las ventajas que la microscopía bimodal llevan consigo superan con creces las dificultades que aparecen. Estas ventajas son:

- Aumento en la resolución lateral de la imagen.

La resolución lateral es la capacidad del microscopio de distinguir dos objetos separados una determinada distancia. En las imágenes que se presentan en la siguiente sección se observa un aumento en la resolución lateral en el canal del segundo modo con respecto al canal de topografía. Las razones por las que esto ocurre están bajo debate y se discutirán a lo largo de esta tesis. En este capítulo también se presentan simulaciones con el objetivo de entender dicho aumento y los parámetros de los que depende.

- Aumento en el contraste de fase conservativo.

La fase del primer modo está ligada a la energía disipada entre la punta y la muestra. Suponiendo que el movimiento de la punta es armónico y que la energía de la fuerza de excitación se pierde hidrodinámicamente en el medio o disipativamente en la muestra [135, 136] se tiene que:

$$E_{\text{dis},n} = \frac{\pi k_n A_n}{Q_n} \left(A_{0n} \sin \phi_n - \frac{A_n \omega}{\omega_{0n}} \right) \quad (3.2)$$

En el capítulo 4 se discutirá en detalle esta ecuación. En lo que a este capítulo se refiere, se incluye la expresión porque explica la importancia de los canales bimodales como canales adicionales a través de los que se puede extraer información composicional. Cuando las fuerzas son conservativas ($E_{\text{dis}} = 0$) y la realimentación mantiene la amplitud del primer modo igual a una amplitud de trabajo ($A_1 = A_{sp}$), la fase del primer modo está bloqueada. Sin embargo, A_2 no es constante y consecuentemente ϕ_2 también varía, proporcionando un contraste puramente conservativo. Este hecho está bien establecido [137, 138] y se aprecia en muchas de las imágenes que aparecen en la siguiente sección.

3.1.3. Objetivos

El objetivo fundamental de este capítulo es la implementación de la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos. Se intentarán trasladar las características que hacen de la microscopía de fuerzas bimodal una alternativa a la microscopía de fuerzas convencional (aumento en la resolución lateral y contraste composicional conservativo) al medio líquido. Además, se intentarán comprender estas características para así aplicarlas de forma práctica en los experimentos.

3.2. Resultados experimentales

3.2.1. Implementación de la microscopía de fuerzas bimodal

La implementación de la microscopía de fuerzas bimodal requiere dos generadores de señales para crear la señal de excitación bimodal, dos lock-in amplifier para extraer la amplitud y fase de cada modo, y un circuito sumador para enviar la señal bimodal a la micropalanca (véase figura 3.1). En nuestro laboratorio existen varias unidades que fueron fabricadas antes de mi llegada, y que incluyen un generador de señales y dos lock-in adicionales en una unidad compacta (unidad bimodal) que se conecta al controlador del microscopio. Se ha encontrado que en algunos casos el uso de la unidad bimodal es recomendable debido a las altas ganancias que tiene y de las que carecen los lock-ins adicionales de los microscopios comerciales. Estas ganancias pequeñas implican la necesidad de una amplitud de excitación alta para obtener una amplitud apreciable del segundo modo, lo que en muchas ocasiones supone un aumento no deseado del ruido electrónico. Los experimentos se han llevado a cabo en tres tipos de microscopio: un Multimode (Veeco), un MP3-3D (Asylum Research) y un microscopio optimizado en el que se ha minimizado el ruido electrónico [6] (véase apéndice 6.7). En todos ellos se han podido obtener imágenes en los canales bimodales, si bien la resolución lateral de las mismas está determinada por el microscopio utilizado y el medio en el que está inmersa la muestra.

3.2.2. Experimentos en condiciones ambiente

La microscopía de fuerzas bimodal ya había sido utilizada para tomar imágenes de alta resolución de muestras especialmente difíciles. En microscopía de fuerzas se entiende como complicada una muestra fácil de destruir cuando se mide. Como se mencionó en la introducción, el inconveniente de los modos estáticos es que las fuerzas aplicadas son altas. A pesar de que se utilizan micropalancas de menor constante de fuerzas para minimizar la fuerza aplicada, las fuerzas de contacto pueden llegar a ser órdenes de magnitud mayores que las fuerzas de no contacto [19], dependiendo de la distancia entre la punta y la muestra. En particular, el grupo de Engel en Basilea es mundialmente conocido por sus imágenes de alta resolución sobre redes bidimensionales de proteínas utilizando el modo de contacto (véanse figuras 1.9 y 1.10 en el capítulo 1). Las fuerzas aplicadas en estos casos están entre 0.1 y 1 nN [139]. Las proteínas individuales carecen del soporte lateral que tienen las proteínas que constituyen un cristal bidimensional. Hasta mi conocimiento, no existen imágenes de proteínas individuales en modo contacto, ya que si intentamos tomar una imagen en modo contacto de una proteína sobre un sustrato la arrastraremos debido a que la fuerza entre la punta y la muestra es superior a la que mantiene unida la proteína al sustrato. En el peor de los casos, la fuerza aplicada será incluso superior a la que mantiene ligada los fragmentos constituyentes de la proteína entre sí y la destruiremos. Por esta razón, los modos dinámicos son necesarios para la adquisición

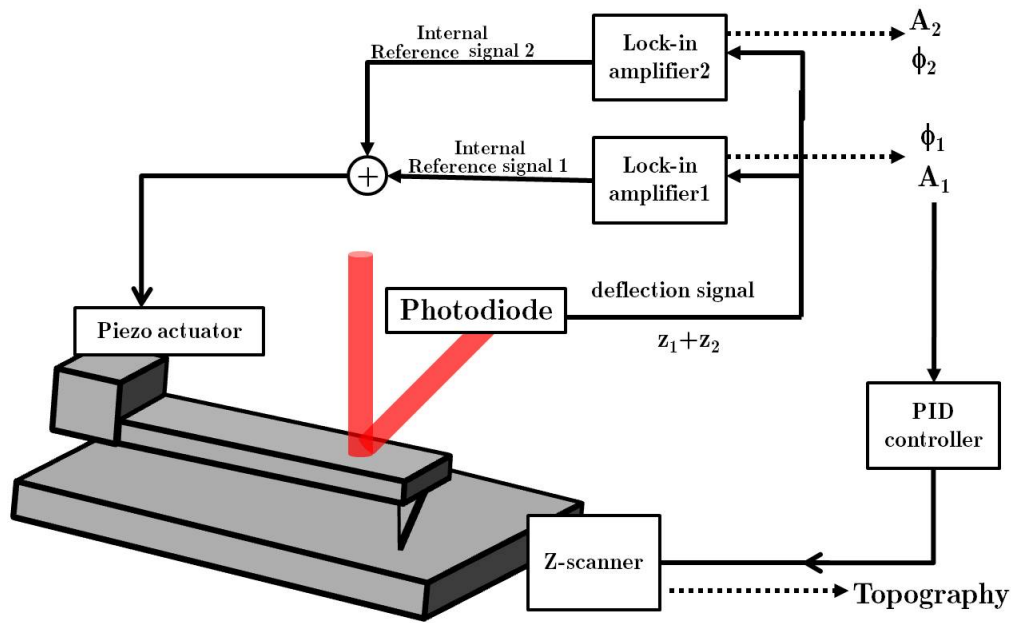


Figura 3.1: Implementación de la excitación bimodal en el microscopio. La señal bimodal se utiliza como excitación de la micropalanca. Los lock-in amplifiers extraen la respuesta de la micropalanca a las frecuencias del primer y segundo modo de oscilación flexurales. La realimentación mantiene A_1 constante, mientras que existen tres canales auxiliares A_2 , ϕ_1 y ϕ_2 válidos para la adquisición de imágenes.

de imágenes de moléculas individuales. Además, si es posible es esencial trabajar en el modo atractivo para así minimizar la fuerza aplicada [140].

Bajo estas condiciones de medida se pueden observar los fragmentos F_{ab} y F_c constituyentes de un anticuerpo IgG cuyo tamaño es de aproximadamente 6 nm en condiciones ambiente [140]. Para ello es esencial utilizar una amplitud libre pequeña ($A_0 < 6$ nm) para así aumentar la resolución lateral. Como mencioné en la introducción, esto minimiza la contribución de las fuerzas de largo alcance y maximiza las de las fuerzas de corto alcance, ya que de esta forma la micropalanca opera en un rango donde existe una variación más rápida de la fuerza con la distancia. Esto implica trabajar con una micropalanca de constante de fuerzas muy alta ($k = 40$ N/m) para así incrementar la energía de la micropalanca y evitar que ésta se pegue a la superficie debido a las fuerzas capilares existentes.

La microscopía de fuerzas bimodal en aire también es capaz de resolver los constituyentes de un anticuerpo IgG. La ventaja de utilizarla reside en que las condiciones de trabajo necesarias son más sencillas de obtener desde el punto de vista experimental. En particular, en 2007 se obtuvieron imágenes bimodales en las que se podían observar los fragmentos constituyentes de anticuerpos IgG y de anticuerpos pentaméricos IgM [121] con una amplitud libre de hasta 20 nm y consecuentemente una distancia punta-muestra media mayor y una menor fuerza media aplicada. La microscopía de fuerzas bimodal también ha sido utilizada por otros grupos de forma exitosa en el régimen repulsivo [120, 124].

En esta sección se presentan los resultados obtenidos en condiciones ambiente y que coinciden en gran medida con los experimentos realizados anteriormente. Todas las muestras biológicas han sido depositadas sobre mica debido tanto a sus propiedades topográficas (es muy plana) como a sus propiedades eléctricas (está cargada negativamente en agua, lo que favorece la fisisorción de las proteínas).

En la figura 3.2 se puede observar imágenes de anticuerpos IgG sobre mica en aire. Estos tetrámeros están constituidos por cuatro cadenas polipéptidas (dos pesadas y dos ligeras) que forman una estructura en forma de Y griega compuesta por dos fragmentos F_{ab} o fragmentos de unión al antígeno y por un fragmento F_c . Cada fragmento mide entre 6 y 6.5 nm, por lo que el tamaño del anticuerpo depende de la configuración en la que éste se deposite sobre el sustrato. Se pueden hallar anticuerpos depositados sobre mica en forma de Y griega fácilmente cuyas dimensiones laterales medidas mediante microscopía de fuerzas son entre 12 y 20 nm. Los anticuerpos IgG (Sigma Aldrich - I8260) fueron diluidos en agua destilada hasta una concentración de 1:1000 e incubados durante 20 s sobre mica recién exfoliada. Después se enjuagó la muestra con agua destilada y se secó con un ligero flujo de N_2 . La figura 3.2 muestra las imágenes obtenidas en dos experimentos diferentes. En el primer experimento se estudia la muestra utilizando la microscopía de fuerzas convencional. Las imágenes que aparecen en las figuras 3.2a-c corresponden a imágenes de topografía con amplitudes libres muy bajas ($A_{01} < 6$ nm) y una micropalanca de constante de fuerza muy alta ($k_1 \approx 40$ N/m). En ellas se distinguen los tres fragmentos que forman un anticuerpo IgG. En el segundo experimento, realiza-

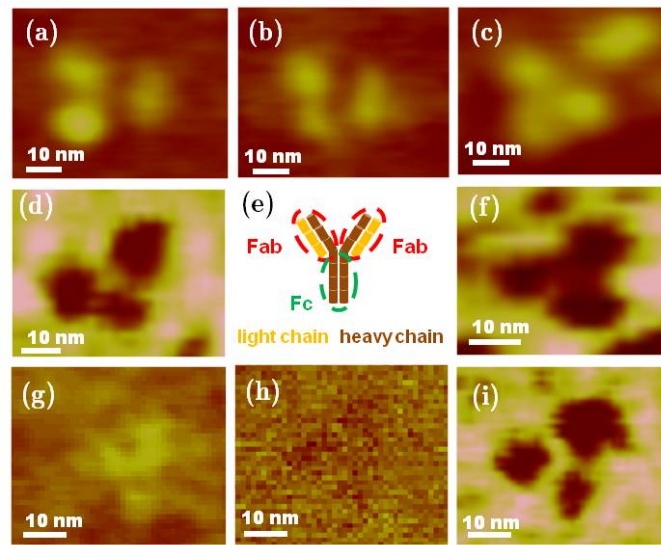


Figura 3.2: (a)-(c) Imágenes de topografía de un anticuerpo IgG en aire sobre mica utilizando la microscopía de fuerzas convencional en modulación de amplitud. (d)-(f) imágenes de ϕ_2 y esquema de un anticuerpo IgG en aire sobre mica. Las imágenes de ϕ_2 muestran los tres fragmentos del anticuerpo. Imágenes de (g) topografía, (h) ϕ_1 y (i) ϕ_2 de un anticuerpo IgG en aire sobre mica utilizando la microscopía de fuerzas bimodal que muestran el contraste conservativo que el canal de ϕ_2 proporciona cuando el canal ϕ_1 está bloqueado.

do con otro tipo de micropalanca, se estudia la muestra utilizando la microscopía de fuerzas bimodal. Las figuras 3.2d,f presentan imágenes en el canal de fase del segundo modo obtenidas con unas amplitudes libres casi del triple ($A_{01} \approx 20$ nm) y una constante de fuerzas de la micropalanca cuatro veces menor ($k_1 \approx 10$ N/m) que las utilizadas en el experimento anterior. Se puede observar que la resolución lateral obtenida en el canal de ϕ_2 es idéntica a la obtenida en el canal de topografía en el experimento realizado utilizando microscopía de fuerzas convencional, pudiéndose también diferenciar los tres fragmentos del anticuerpo. Éste es el aumento de resolución lateral que proporciona el segundo modo con respecto al canal de topografía y que fue mencionado en la introducción.

En el segundo experimento que se muestra también se ha estudiado el contraste conservativo también anteriormente mencionado en la introducción. Las figuras 3.2g-i corresponden a las imágenes de topografía, fase del primer modo (ϕ_1) y fase del segundo modo (ϕ_2) respectivamente. La imagen de ϕ_1 en modulación en amplitud (véase figura 3.2h) es un mapa del contraste disipativo en la muestra (véase ecuación 3.2). Si existe energía disipada es difícil pensar que ésta es la misma sobre dos muestras de propiedades mecánicas diferentes. Lo más coherente es pensar que la energía disipada, de existir, es muy pequeña, y que la fuerza se puede aproximar por una fuerza conservativa. Esto coincide con el hecho de que la imagen se toma en régimen atractivo y con una amplitud de trabajo muy cercana a la amplitud libre. Sin embargo, en estas condiciones el contraste de fase en el segundo modo ϕ_2 no está bloqueado (véase figura 3.2i) y proporciona un mapa del contraste conservativo sobre la muestra.

La figura 3.3(a) corresponde a la imagen de ϕ_2 de una muestra bien distribuida de anticuerpos pentaméricos IgM sobre mica en aire. Estos anticuerpos son de mayor tamaño (alrededor de 30 nm) ya que están formados por cinco anticuerpos IgG y una cadena polipéptida (cadena j) que une dos de las cadenas polipéptidas de los anticuerpos IgG entre sí. Para la preparación de la muestra, los anticuerpos IgM (Sigma Aldrich - A6029) fueron diluidos hasta una concentración de 1:60 e incubados durante 30 segundos sobre mica recién exfoliada. Después se enjuagó la muestra con agua destilada y se secó con un ligero flujo de N_2 . En las imágenes de topografía (figuras 3.3b,c) no se observan las subunidades. Sin embargo, las correspondientes imágenes de ϕ_2 (figuras 3.3d,e) muestran un aumento sustancial de la resolución lateral, ya que se pueden distinguir las subunidades correspondientes a los IgG que lo forman y en algunos casos incluso fragmentos constituyentes de estos IgG. En la figura no se muestran las imágenes de ϕ_1 debido a su ausencia de contraste, al igual que se había encontrado en las imágenes correspondientes a los anticuerpos IgG adquiridas en microscopía de fuerzas bimodal. En este caso, la constante de fuerza de la micropalanca utilizada es también de aproximadamente $k \approx 10$ N/m. Sin embargo, la amplitud libre era menor ($A_0 \approx 15$ nm) que en el caso del experimento realizado sobre la muestra de anticuerpos IgG debido a que es necesario disminuir A_0 porque la altura de los anticuerpos IgM dificulta las medidas en régimen atractivo con amplitudes libres altas.

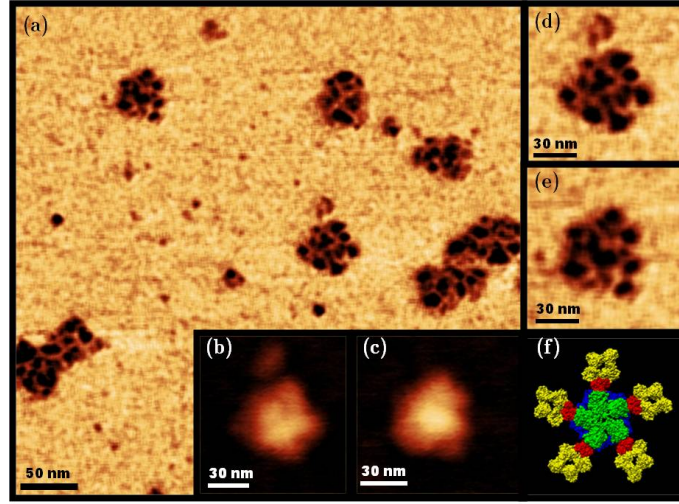


Figura 3.3: (a) Imagen de ϕ_2 de una muestra bien distribuida de anticuerpos pentaméricos IgM en aire sobre mica utilizando la microscopía de fuerzas bimodal. Imágenes de (b)-(c) topografía y (d)-(e) ϕ_2 de dos anticuerpos IgM. (f) Modelo del IgM construido a partir de la secuencia de sus aminoácidos y de un modelo cristalográfico del fragmento F_c del IgE tal y como aparece en [141]

La última imagen que se presenta en este capítulo en condiciones ambiente corresponde a una muestra de fibras de colágeno sobre mica. Las fibras de colágeno constan de tres cadenas α enrolladas y unidas mediante puentes de hidrógeno que forman una triple hélice dextrógira con una distancia entre las vueltas de 8.6 nm. La figura 3.4a muestra una imagen de topografía correspondiente a una $A_0 = 15$ nm adquirida con una micropalanca de constante de fuerzas $k \approx 10$ N/m. Tanto en la imagen de A_2 como en la de ϕ_2 (véanse figuras 3.4b y 3.4c) se observan detalles que no están presentes en la imagen de topografía, mostrando incluso la periodicidad de la hélice.

Se ha comprobado que la imagen en los canales bimodales A_2 y ϕ_2 depende del cociente de amplitudes libres A_{01}/A_{02} . En los experimentos presentados en esta sección es del orden de 20. Se ha observado que para incrementar el contraste bimodal es fundamental maximizar el cociente de amplitudes libres. Para ello se puede, bien maximizar A_{01} hasta el límite que permita la operación en el régimen atractivo (para una punta de $R \approx 2$ nm, $A_{01} < 20$ nm), o bien disminuir A_{02} hasta el límite que permita el nivel de ruido del microscopio (en nuestro montaje experimental, $A_{02} > 0.5$ nm).

3.2.3. Experimentos en líquidos

La implementación de la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos es un paso natural que el método exigía, ya que su máxima ventaja en condiciones ambiente era su aplicación a la medida de muestras frágiles (facilitado por el aumento de resolución

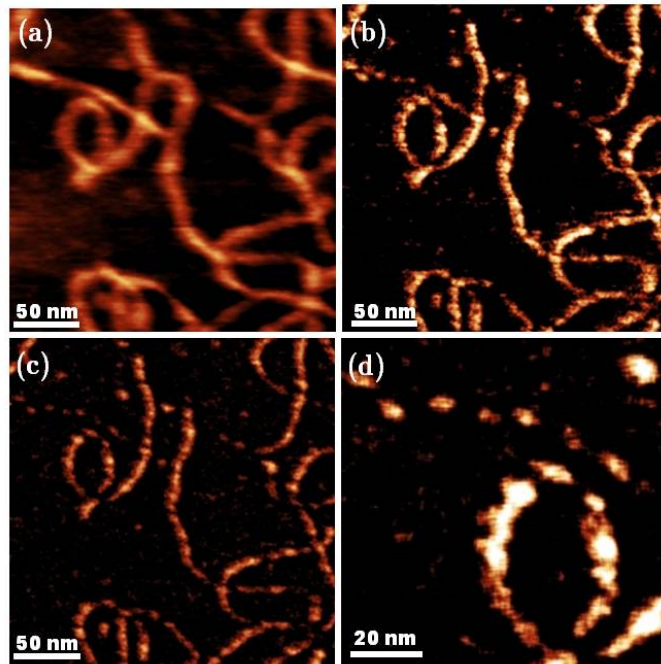


Figura 3.4: Muestra de fibras de colágeno en aire sobre mica utilizando la microscopía de fuerzas bimodal. Imágenes de (a) topografía, (b) ϕ_2 y (c)-(d) A_2 utilizando la microscopía de fuerzas bimodal.

lateral con amplitudes libres grandes, lo que implica una distancia media entre la punta y la muestra grande). Estas muestras frágiles suelen ser de origen biológico y tener como medio natural el líquido. Existen dos motivos principales para intentar medir las muestras en su medio fisiológico. Por una parte, estas proteínas medidas en condiciones ambiente se deshidratan, lo que modifica su forma y tamaño. Por otra, también se desnaturalizan, perdiendo su funcionalidad. Al medir en líquidos las complicaciones que aparecen son principalmente dos.

Por una parte, las fuerzas hidrodinámicas (véase el capítulo 2) modifican la dinámica de la micropalanca. La excitación acústica es la excitación más sencilla de implementar desde el punto de vista experimental. Por esta razón, el espectro de la micropalanca es difícil de interpretar (véase la figura 2.2a de la página 42). En estas condiciones es difícil tanto encontrar las frecuencias correspondientes a los primeros dos modos flexurales como obtener una imagen estable.

Por otra parte, las fuerzas de interacción entre punta y muestra se ven modificadas. Las fuerzas atractivas de Van der Waals en líquidos son muy pequeñas (la constante de Hamaker disminuye un orden de magnitud) [19]. La razón de esto es el apantallamiento eléctrico que las moléculas polares de agua provocan. Bajo estas circunstancias, es prácticamente imposible medir en el régimen atractivo, régimen que había proporcionado condiciones óptimas de operación bimodal en condiciones ambiente.

Celda de fluidos

Al igual que ocurría en la microscopía de fuerzas convencional en líquidos (véase el capítulo 2), en la microscopía de fuerzas bimodal es fundamental optimizar el espectro de una micropalanca excitada acústicamente en líquidos. Este espectro depende de la celda de fluidos y el tipo de micropalancas utilizadas. La mayor parte de experimentos en líquido se han realizado en una celda como la de la figura 3.5a, donde la colocación del piezoeléctrico en la celda de fluidos provoca una vibración de la celda completa y la consecuente aparición de un bosque de picos en el espectro en frecuencia. Es necesario llevar a cabo un análisis de ruido térmico para encontrar las resonancias reales de la micropalanca. Cuando la fuerza de excitación es nula la oscilación temporal de la micropalanca sólo se debe al ruido térmico. Si se registra esta oscilación y a continuación se realiza una transformada de Fourier se pueden hallar las frecuencias correspondiente al primer y al segundo modo de oscilación de la micropalanca vibrando en líquidos. Una vez halladas, el usuario debe situarse en un pico de resonancia cercano a las mismas; en algunos casos esto es sencillo, pero en otros casos las resonancias reales están situadas en una parte del espectro bastante plana. Se ha estudiado el espectro correspondiente a tres tipos de micropalanca. Por una parte, micropalancas rectangulares (micropalancas Olympus OMCL-RC800PSA) de constante de fuerzas $k = 0.39$ N/m cuya frecuencia de resonancia del primer y del segundo modo en agua es de $f_{01} \approx 22.4$ kHz y $f_{02} \approx 135$ kHz respectivamente. En la figura 3.5b se puede observar que para la misma amplitud de excitación, la respuesta del segundo modo es más de 10 veces mayor que la del primero. Esto hace que estas micropalancas sean muy recomendables para obtener buenas imágenes bimodales. También se utilizaron micropalancas rectangulares (más largas y de menor constante de fuerzas $k = 0.05$ N/m) con $f_{01} = 8$ kHz y $f_{02} = 50$ kHz. En este caso, la respuesta del segundo modo (figura 3.5c) es muchísimo menor que la del primero. Esto también sucede utilizando micropalancas triangulares de constante de fuerzas $k = 0.35$ N/m (micropalancas Olympus OMCL-TR400PSA) de $f_{01} = 6.6$ kHz y $f_{02} = 60$ KHz (figura 3.5d). La razón de esta diferencia es que en el rango de frecuencias entre 45 y 75 kHz el espectro del líquido de la celda es muy plano y su convolución con el de la micropalanca produce una reducción en la magnitud del pico del segundo modo cuando la frecuencia de éste está dentro de este rango. Las micropalancas óptimas para la topografía (véase figura 3.5c, donde el pico térmico coincide con una resonancia del fluido de la celda alrededor de 9 kHz) no lo son para optimizar la respuesta bimodal. Por esta razón, en los experimentos realizados en líquidos se han utilizado las micropalancas rectangulares de constante de fuerzas más altas (figura 3.5b) a pesar de que con ellas existen dificultades a la hora de obtener una buena topografía debido a que el pico correspondiente al primer modo queda en una zona del espectro bastante plana y el incremento en F_{01} que esto conlleva implica un incremento no deseado en el ruido electrónico. Si se hubiera utilizado excitación magnética no se hubiera tenido este problema y se hubiera podido optimizar tanto el canal de topografía como los canales bimodales.

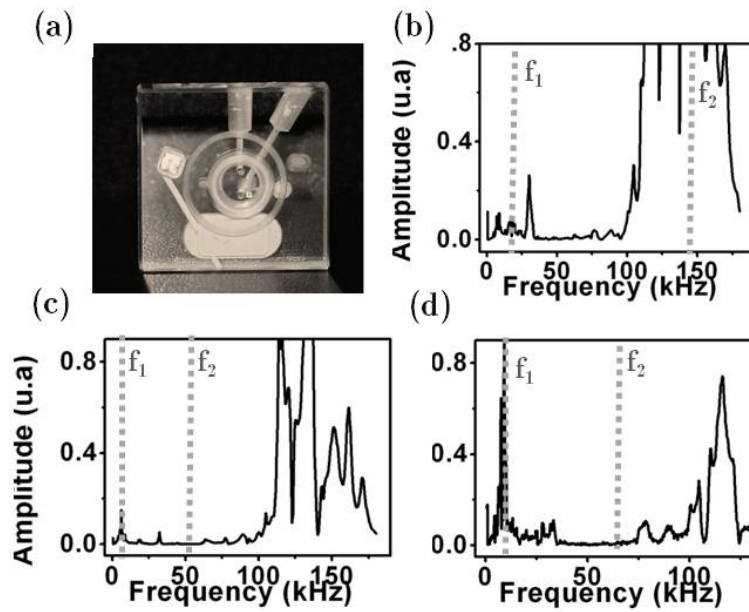


Figura 3.5: (a) Celda de fluidos comercial. El piezoeléctrico hace vibrar la celda completa y no sólo la micropalanca. Espectros en agua para una micropalanca excitada acústicamente (b) rectangular, $k = 0.39 \text{ N/m}$, (c) rectangular, $k = 0.05 \text{ N/m}$ y (d) triangular, $k = 0.35 \text{ N/m}$. Las líneas discontinuas señalan las frecuencias correspondientes al primer y al segundo modo de resonancia flexural obtenidas en base al análisis del espectro de ruido térmico.

Debido a que en agua no es generalmente posible medir en régimen atractivo, las fuerzas aplicadas sobre la muestra son mucho mayores a pesar de que las micropalancaas utilizadas en este medio son más blandas. Este aumento de la fuerza máxima y media debido a la presencia de las fuerzas de contacto hace que sea más difícil tomar imágenes de moléculas individuales en medio líquido sin dañarlas ni arrastrarlas. Además, las micropalancaas óptimas para la obtención de la imagen bimodal no lo son para la de topografía, y el rango de operación se limita aún más. Por ambos motivos la microscopía de fuerzas bimodal, que se aplica fácilmente en condiciones ambiente, es más difícil de implementar en líquidos.

A pesar de estas dificultades, se han podido obtener imágenes de anticuerpos pentaméricos IgM en agua con buena resolución. En la figura 3.6a se presenta una imagen de fase del segundo modo, en la que se observa una distribución uniforme de anticuerpos en los que se pueden distinguir los cinco monómeros que los forman. También están presentes las dos características principales propias de la microscopía de fuerzas bimodal. Por una parte, las figuras 3.6d-g muestran el aumento en resolución lateral: en la imagen de ϕ_2 es posible observar los monómeros e incluso la cadena J, mientras que en la imagen de topografía éstos no se diferencian. Por otra parte, las figuras 3.6h-k son representativas del mapa de contraste conservativo que se tiene en los canales bimodales. El bloqueo de contraste en ϕ_1 indica que no existe contraste disipativo, lo que implica que la disipación, de existir, es despreciable frente a las interacciones elásticas. Sin embargo, el segundo modo no está sujeto a realimentación y el contraste en ϕ_2 proporciona un mapa del contraste conservativo sobre la muestra. El cociente de amplitudes utilizado en estas imágenes es bastante alto ($A_{01} = 9.4$ nm, $A_{02} = 1.4$ nm y $A_{sp} = 6.7$ nm), aunque casi la mitad que el que optimizaba las medidas en aire.

Otra muestra con la que he trabajado sistemáticamente para estudiar la microscopía de fuerzas en líquidos es la chaperonina GroEL (figura 3.7). Esta proteína es un tetradecámero (consta de 14 subunidades) que forma dos anillos (cis y trans) consistentes en siete subunidades cada uno. Los estudios por cristalografía de rayos x indican que su diámetro es de aproximadamente 14 nm, su altura de aproximadamente 15 nm y tiene un canal central de aproximadamente 4.5 nm de diámetro. Las proteínas de GroEL mantienen su conformación nativa cuando se depositan sobre la mica, que es hidrofílica. Se unen a ella a través de su dominio apical, conservando sus dominios hidrofóbicos en el interior y formando un cristal bidimensional [142, 143]. En principio se podría pensar que este cristal bidimensional soporta mejor las fuerzas aplicadas, al estar las proteínas confinadas en el plano horizontal xy, como ocurre en el resto de cristales bidimensionales (véase los cristales bidimensionales de bR en los capítulos 1 y 5). Sin embargo, la red bimidimensional que el GroEL forma ha de ser medida bajo la aplicación de fuerzas pequeñas, ya que un pequeño cambio en la fuerza de interacción puede llegar, o bien a diseccionar el anillo de GroEL [73], o a destruir grandes áreas de la red. Por ello las imágenes obtenidas tienen una amplitud

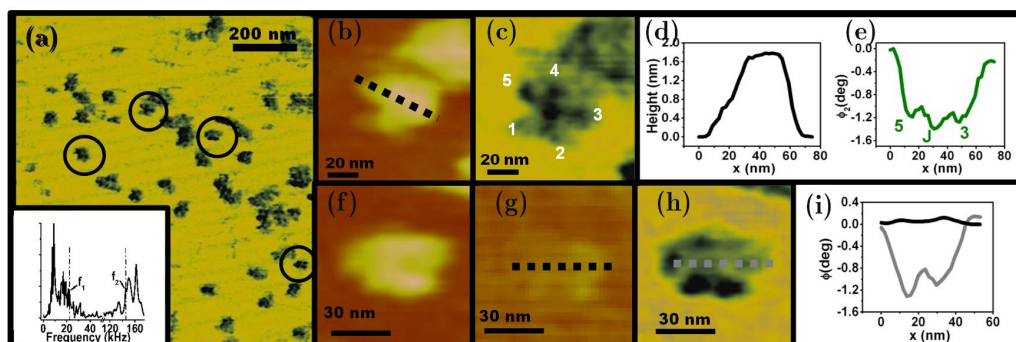


Figura 3.6: (a) Imagen de ϕ_2 de una muestra de anticuerpos IgM en agua utilizando la microscopía de fuerzas bimodal y una celda de fluidos comercial. En el recuadro, respuesta en frecuencias de la micropalanca que muestra el bosque de picos debido a las resonancias de la celda y del líquido de la celda y frecuencias de resonancia del primer y segundo modo de oscilación (líneas discontinuas) halladas a través de un análisis del espectro de ruido térmico. Imágenes de (b) topografía y (c) ϕ_2 de un anticuerpo IgM y (d)-(e) sus correspondientes perfiles a lo largo de las líneas punteadas en (b)-(c). Imágenes de (f) topografía, (g) ϕ_1 y (h) ϕ_2 y (i) correspondiente perfil a lo largo de la línea punteada en (g)-(h) que muestran el bloqueo en el contraste de ϕ_1 y la imagen de ϕ_2 como un mapa del contraste conservativo sobre la muestra.

de trabajo¹ muy alta ($A_{sp} = 0.95A_{01}$) y son muy sensibles a operar en un pico lejano al de resonancia. La red de GroEL se puede estudiar con o sin fijarla a la mica por medio de agentes químicos (por ejemplo, glutaraldehído). Se ha utilizado tanto buffers que contienen Tris como buffers que contienen HEPES. Normalmente se utilizan dos buffers, uno para incubar la muestra, en el que la presencia de electrolitos ha de ser alta para favorecer la adsorción de la proteína al sustrato [144], y otra con una concentración de sales más baja para medir la muestra. Se observan diferencias importantes dependiendo de la punta y de la cantidad de agregados que esté presente en los buffers utilizados. En particular, para adquirir imágenes sobre la muestra de GroEL de la figura 3.7 se disolvió la proteína hasta obtener una concentración homogénea de $50\mu\text{g/ml}$ en buffer de pH 7.5 preparado con 50mM de Tris-HCl, 150mM KCl y 10mM MgCl_2 . Luego se incubó sobre la mica durante 40 minutos, se añadió glutaraldehído (diluido al 25 %) durante 5 minutos y se enjuagó la muestra con buffer de 25mM de Tris-HCl, 150mM KCl y 10mM MgCl_2 . Para la adquisición de las imágenes la muestra y la micropalanca fueron sumergidas en aproximadamente 60

¹Existe un gran error experimental en relación a la estimación de la amplitud de trabajo de una imagen en líquidos debido a la deriva del pico de resonancia: los cambios de temperatura pueden producir cambios en la densidad de hasta un 2.5 % en agua en condiciones ambiente que cambian las fuerzas hidrodinámicas y afectan la dinámica de la micropalanca. Si se quiere hacer un análisis riguroso lo más aconsejable es fijar una realimentación adicional tal que la amplitud de trabajo no varíe durante la imagen [130].

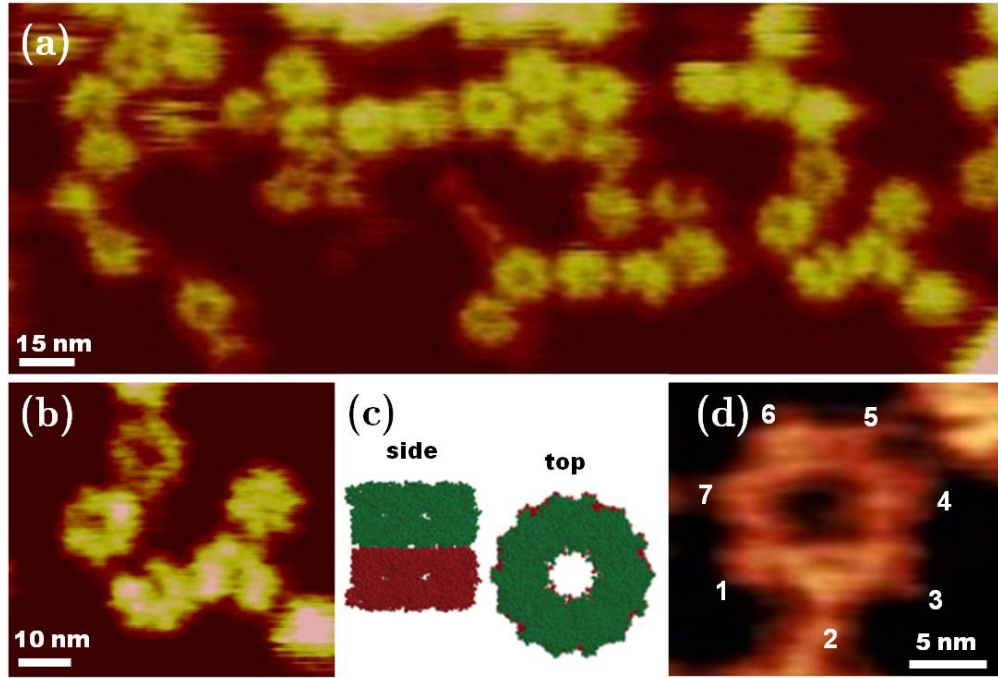


Figura 3.7: (a)-(b) Imágenes de topografía de la red de GroEL en buffer, (c) estructura cristalina de una proteína de GroEL medida por cristalografía de rayos X tal y como aparece en [145] y (d) imagen de una proteína de la red donde se resuelven las 7 subunidades del anillo.

μl de este mismo buffer. Es importante que la muestra de GroEL no se deje secar en ningún momento. La figura 3.7 muestra que las imágenes de topografía obtenidas tienen una muy buena resolución, pudiéndose observar las siete subunidades de la proteína con una $A_{01} = 4 \text{ nm}$ y una micropalanca de $k = 0.37 \text{ N/m}$.

Cuando se intenta medir esta muestra en líquidos utilizando los parámetros válidos para la microscopía de fuerzas bimodal sobre anticuerpos IgM en líquidos, esto es, si se intenta utilizar un cociente de amplitudes A_{01}/A_{02} de aproximadamente 6, la muestra de GroEL se destruye con facilidad. Sin embargo, se ha encontrado que existe otro rango de amplitudes ($A_{01} \approx A_{02}$) pequeñas donde la imagen de ϕ_2 es mucho mejor que la imagen de topografía, que bajo esta situación es muy inestable. En la figura 3.8a-b se muestra una imagen bimodal de GroEL sobre mica en los canales de topografía y ϕ_2 utilizando este cociente de amplitudes. Esta imagen ha sido obtenida en un microscopio no comercial en el que el ruido electrónico ha sido minimizado hasta obtener una densidad de ruido electrónico de $40\text{fm}/\sqrt{\text{Hz}}$ [6] en líquidos (véase apéndice 6.7). En 2005 se publicaron imágenes con verdadera resolución atómica en FM-AFM en líquidos utilizando un microscopio similar al que se ha utilizado en estos experimentos [32]. Este microscopio ha posibilitado trabajar con unas amplitudes libres muy pequeñas ($A_{01} \geq 100 \text{ pm}$). Esta minimización del ruido electrónico ha hecho posible medir la periodicidad de la mica en líquidos uti-

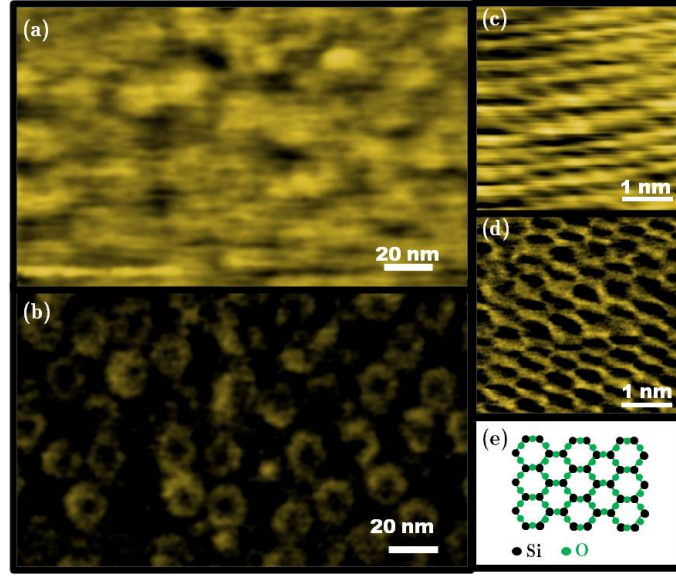


Figura 3.8: Imagen de (a) topografía y (b) ϕ_2 de la red de GroEL en buffer. Imagen de (c) topografía, (d) ϕ_2 y (e) esquema de la red de mica en buffer.

lizando la microscopía de fuerzas en modulación de amplitud, hasta mi conocimiento algo no publicado hasta la fecha (véase figura 3.8d). Una vez se ha disminuido el ruido electrónico, la elección de la constante de fuerzas de la micropalanca es un factor decisivo para disminuir el ruido térmico. Es preciso utilizar micropalancas con constante de fuerzas altas ($k \approx 40 \text{ N/m}$) para que la posición de la micropalanca no fluctúe demasiado debido al ruido térmico y la punta no sienta la fuerza de un promedio de átomos de la muestra, sino de uno sólo. Para la adquisición de imágenes sobre la mica, se utilizó una micropalanca de $k \approx 40 \text{ N/m}$, $f_0 \approx 130 \text{ kHz}$, $Q = 8$, $A_{01} \approx 100 \text{ pm}$ y $A_{sp} \approx 0.9A_{01}$. En el caso de la red de GroEL, se utilizó una micropalanca de menor constante de fuerzas para evitar dañar la red ($k \approx 0.73 \text{ N/m}$), $f_0 \approx 22 \text{ kHz}$, $Q = 6$, $A_0 \approx 300 \text{ pm}$ y $A_{sp} \approx 0.95A_{01}$. Las imágenes obtenidas sobre mica y sobre GroEL se muestran en la figura 3.8. Las imágenes de topografía (figuras 3.8a,c) están sujetas a inestabilidades en la realimentación provocadas por el uso de amplitudes libres tan pequeñas. Sin embargo, en las imágenes de ϕ_2 estas fluctuaciones no están presentes. En la figura 3.8b se muestra una imagen de alta resolución en el canal de ϕ_2 de la red bidimensional de GroEL en la que se resuelven las 7 subunidades del anillo. En la figura 3.8d también se observa una imagen de alta resolución de la periodicidad de la mica que corresponde a las posiciones que ocupan los átomos de silicio en la red teórica (figura 3.8e).

3.3. Interpretación de los resultados experimentales

Para interpretar de forma teórica los resultados experimentales es necesario modelar la respuesta de la micropalanca. Para ello se utilizarán las ecuaciones correspondientes a excitación magnética. A partir de la relación 2.79 se obtienen ecuaciones diferenciales ordinarias para los modos de vibración $Y_k(t)$ de una micropalanca excitada en la punta e interaccionando con la muestra a través de una fuerza aplicada en la punta y dependiente en la distancia $F_{ts}(d)$. La proyección en la posición de la punta sobre cada modo de oscilación $z_k(t)$ viene dada por:

$$z_k(t) = \phi_k(1)Y_k(t) = 2(-1)^k Y_k(t) \quad (3.3)$$

Podemos escribir la ecuación del movimiento 2.79 en función de esta proyección:

$$\ddot{z}_n(t) + \frac{\omega_{0,n}}{Q_n} \dot{z}_n(t) + \omega_{0,n}^2 z_n(t) = \frac{F_{exc}(t) + F_{ts}(d)}{m} \quad (3.4)$$

donde $\omega_{0,n}$, Q_n son la frecuencia de resonancia y el factor de calidad de cada modo de la micropalanca, m es la masa de la micropalanca y d es la distancia entre la punta y la muestra ($d(t) = z_c - z(t)$).

En modulación en amplitud, la micropalanca se excita siempre a una frecuencia y amplitud constantes:

$$F_{exc}(t) = F_0 \cos(\omega_{exc}t) \quad (3.5)$$

Normalmente esta frecuencia coincide con la de resonancia de la micropalanca ($\omega_{exc} = \omega_0$). En microscopía de fuerzas bimodal, la micropalanca se excita simultáneamente a las frecuencias correspondientes a los dos primeros modos flexurales de vibración:

$$F_{exc}(t) = F_{01} \cos(\omega_1 t) + F_{02} \cos(\omega_2 t) \quad (3.6)$$

donde ω_1 , ω_2 , F_{01} y F_{02} son las frecuencias de resonancia y fuerzas de excitación de los dos primeros modos. Ello hace que la micropalanca responda oscilando a las frecuencias de los dos primeros modos. Suponiendo que las contribuciones de los modos mayores a 2 son despreciables y que la de los armónicos de la frecuencia de excitación también:

$$z(t) = z_1 + z_2 = A_1 \cos(\omega_1 t - \phi_1) + A_2 \cos(\omega_2 t - \phi_2) \quad (3.7)$$

De tal forma que los dos primeros modos de la micropalanca en microscopía de fuerzas bimodal cumplen el sistema de ecuaciones:

$$\ddot{z}_1(t) + \frac{\omega_{0,1}}{Q_1} \dot{z}_1(t) + \omega_{0,1}^2 z_1(t) = \frac{F_{01} \cos(\omega_1 t) + \frac{F_{02}}{m} \cos(\omega_2 t) + F_{ts}(d)}{m} \quad (3.8)$$

$$\ddot{z}_2(t) + \frac{\omega_{0,2}}{Q_2} \dot{z}_2(t) + \omega_{0,2}^2 z_2(t) = \frac{F_{01} \cos(\omega_1 t) + F_{02} \cos(\omega_2 t) + F_{ts}(d)}{m} \quad (3.9)$$

Bajo estas condiciones, las ecuaciones están acopladas debido a la dependencia de la fuerza de interacción en ambos modos. Para estudiar este acoplamiento se utilizarán simulaciones numéricas.

3.3.1. Optimización de los parámetros en aire

Como se mencionó en la introducción, existen dos características de la microscopía de fuerzas bimodal que presentan mejoras significativas con respecto a la operación habitual del microscopio: aumento en la resolución lateral, y posibilidad de proporcionar contraste conservativo. En esta sección se intentarán dilucidar las razones de dichas mejoras. Para estudiar lo que sucede en aire en régimen atractivo se considerará como fuerza de interacción la del modelo DMT (que se verá con más detalle en el capítulo 4):

$$F_{\text{DMT}}(d) = \begin{cases} \frac{4E^*\sqrt{R}}{3}(a_0 - d)^{3/2} - \frac{HR}{6a_0^2} & d < a_0 \\ -\frac{HR}{6d^2} & d \geq a_0 \end{cases} \quad (3.10)$$

donde a_0 es la distancia de equilibrio, H es la constante de Hamaker, E^* el módulo de Young efectivo de la muestra, R el radio de la punta, y d la distancia entre la punta y la muestra. El papel de la realimentación en la amplitud del primer modo es esencial para explicar el mapa de ϕ_2 como un mapa del contraste causado por fuerzas conservativas. Por esta razón, en las figuras se suele representar el correspondiente canal bimodal A_2 o ϕ_2 frente al de A_1 en lugar de hacerlo frente al de distancia media z_c . En la figura 3.9 se presenta lo obtenido en los canales de ϕ_1 , A_2 y ϕ_2 frente a A_1 para una micropalanca de $R = 40$ nm, $k_1 = 8.1$ N/m, $k_2 = 318.1$ N/m, $f_{01} = 103.4$ kHz, $f_{02} = 648.0$ kHz, $Q_1 = 325.8$ y $Q_2 = 779.2$, $A_{01} = 7.9$ nm y $A_{02} = 0.25$ nm. De esta forma, cuando se representan curvas correspondientes a $E^* = 500$ MPa y dos constantes de Hamaker diferentes ($H_a = 4 \cdot 10^{-20}$ J y $H_b = 9 \cdot 10^{-20}$ J) y se fija $A_1 = A_{sp}$, aparece de forma muy visual que el contraste en ϕ_1 está bloqueado, a diferencia de lo que sucede con el contraste en A_2 y ϕ_2 (véase figura 3.9). Hemos denominado contraste en un canal a la diferencia entre las curvas en dicho canal correspondientes a dos constantes de acoplo de la fuerza (en este caso, la diferencia entre la curva correspondiente a H_a y la correspondiente a H_b) distintas. Aunque el contraste en los canales bimodales aumente a medida que la amplitud de trabajo A_{sp} disminuye, es necesario evitar trabajar en ese rango para minimizar las fuerzas aplicadas y evitar que la punta salte al régimen repulsivo.

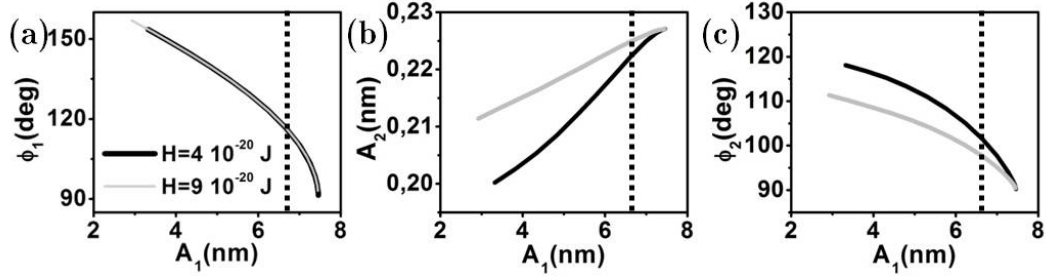


Figura 3.9: Comportamiento de ϕ_1 , A_2 y ϕ_2 frente a A_1 en microscopía de fuerzas bimodal y bajo el efecto de fuerzas conservativas para dos muestras con constante de Hamaker diferente. Las líneas discontinuas indican el funcionamiento del microscopio con realimentación en A_1 . A la amplitud de trabajo ($A_1 = A_{sp}$), ϕ_1 no proporciona contraste para los dos materiales y ϕ_2 y A_2 sí lo hacen.

Sin embargo, para comparar los canales de topografía, ϕ_1 , A_2 y ϕ_2 en cuanto a sensibilidad se refiere, se representarán frente a z_c , lo que corresponde a preguntarnos qué canal sería más sensible en ausencia de realimentación. Como se mencionó en el capítulo 2, la sensibilidad depende de la anchura del pico de resonancia y por tanto del cociente Q_i/k_i . Esto es, para un cambio en la fuerza de interacción dada, más abruptamente variará la amplitud y fase cuanto más estrecho sea el pico de resonancia. Esto sería correcto si estuviéramos operando de forma convencional (utilizando una única frecuencia de excitación) a la frecuencia del primer modo f_{01} o del segundo f_{02} . Esto no es lo que sucede en la microscopía de fuerzas bimodal, donde la excitación bimodal implica un acoplamiento entre ambos modos de oscilación. Esto es, la fuerza F_{ts} depende de ambos modos debido a su dependencia en la distancia d entre la punta y la muestra, que viene dada por:

$$d = z_c + z_0 + z_1 + z_2 + O(\epsilon) \quad (3.11)$$

donde z_0 es la deflexión de la microplancha, $z_1 = A_1 \cos(\omega_1 t - \phi_1)$ y $z_2 = A_2 \cos(\omega_2 t - \phi_2)$.

Esto provoca que el contraste del segundo modo esté muy condicionado por el comportamiento del primero. La ecuación correspondiente a la oscilación del primer modo (ecuación 3.8) es muy parecida a la que tendría la micropalanca oscilando de forma convencional. Sin embargo, la ecuación correspondiente a la oscilación del segundo modo 3.9 es muy distinta de la de un oscilador armónico forzado operando a la frecuencia del segundo modo. Esto es debido a que para un cociente de amplitudes A_1/A_2 alto, el término $z_2(t)$ es despreciable frente al término $z_1(t)$. La fuerza de interacción que aparece en la ecuación correspondiente al segundo modo, que depende de la distancia d , será por tanto muy dependiente de $z_1(t)$. Por esta razón, he realizado simulaciones comparando el contraste en el canal bimodal ϕ_2 para diversos parámetros del primer modo con el fin de encontrar los factores de los que depende,

que, contrariamente a lo que se podría pensar, no están únicamente relacionados con los parámetros del segundo modo.

La figura 3.10 presenta el contraste de los canales ϕ_1 y ϕ_2 frente a z_c para cocientes de amplitudes libres altos ($A_{01}/A_{02} \approx 30 - 60$). Se observa que el contraste en ϕ_1 tiene un máximo, mientras que el contraste en ϕ_2 se invierte y en una región está muy por encima que el contraste en ϕ_1 . Este incremento del contraste en la fase del segundo modo con respecto al contraste en la fase del primer modo para un cociente de amplitudes alto es lo que hemos denominado *efecto bimodal*.

3.3.2. Dependencia del efecto bimodal con el cociente de amplitudes.

En la figura 3.10 se estudia la dependencia del contraste en cada canal de fase en relación al cociente de amplitudes libres A_{01}/A_{02} para una micropalanca de $R = 13$ nm, $k_1 = 4$ N/m, $k_2 = 159$ N/m, $f_{01} = 103.8$ kHz y $f_{02} = 650.5$ kHz. La figura 3.10a-b muestra el efecto de disminuir A_2 desde 0.53 nm a 0.23 nm a una A_{01} fija ($A_{01} = 12.85$ nm) en el contraste de fase de ambos modos. Se observa que el contraste del primer modo no depende de A_2 , mientras que el contraste del segundo modo muestra la presencia de lo que hemos denominado efecto bimodal y que este efecto se hace más significativo cuando A_{02} disminuye a una A_{01} constante.

En las figura 3.10c-d se observa lo que ocurre si se disminuyen A_1 y A_2 manteniendo el cociente de amplitudes libres constante ($A_{01}/A_{02} \approx 25$). El contraste del primer modo crece a medida que A_{01} decrece (véase figura 3.10c). Sin embargo, en estas condiciones el efecto bimodal se hace menos significativo y el contraste en la fase del segundo modo disminuye (véase figura 3.10d). En principio, cuando A_{01} es mayor las fuerzas máximas aplicadas son también mayores. A partir de la ecuación 3.11 se tiene que:

$$d_{\min} = z_c - A_1 - A_2 \quad (3.12)$$

El contraste del primer modo parece verse aumentado a medida que la distancia mínima es mayor y la fuerza máxima aplicada es menor. Sin embargo, el contraste en el segundo modo, no parece seguir una dependencia significativa con la fuerza máxima aplicada, sino que tiene un comportamiento más complejo. El efecto bimodal se hace mayor tanto cuando A_2 decrece a A_{01} fija (lo que correspondería a disminuir la fuerza máxima aplicada), como cuando A_1 crece a A_{01}/A_{02} constante (lo que correspondería a aumentar la fuerza máxima aplicada), situaciones en las que la fuerza máxima tiene comportamientos diferentes. Lo único que es posible concluir en base a las simulaciones realizadas es que para optimizar el contraste en el canal de fase del segundo modo es necesario trabajar con una A_{01} alta y un cociente de amplitudes libres A_{01}/A_{02} también alto. La razón por la que esto ocurre está todavía sin determinar.

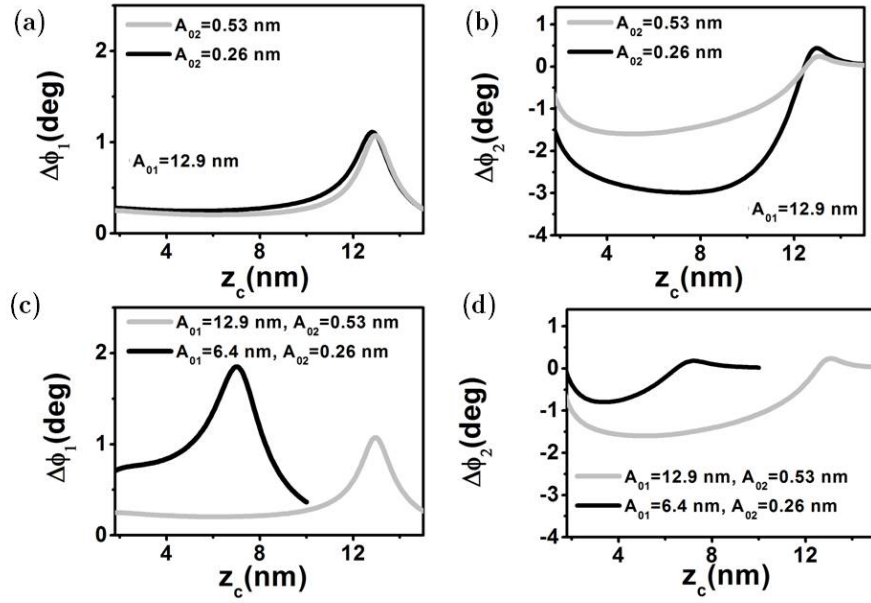


Figura 3.10: Simulaciones en aire utilizando una micropalanca de $Q_1 = 160$ y $Q_2 = 480$ para el contraste de fase obtenidos sobre muestras cuya constantes de Hamaker son $H_a = 10 \cdot 10^{-20} J$ y $H_b = 12 \cdot 10^{-20} J$. Comportamiento del contraste de fase del (a) primer modo y (b) segundo modo cuando se disminuye A_2 desde 0.53 nm a 0.26 nm y se mantiene $A_{01} = 12.85$ nm. Comportamiento del contraste de fase del (c) primer modo y (d) segundo modo cuando se disminuye A_2 desde 0.53 nm a 0.26 nm al mismo tiempo que se disminuye también A_1 desde 12.9 nm a 6.4 nm, de forma que se mantiene constante $A_{01}/A_{02} \approx 25$.

Las simulaciones realizadas concuerdan con lo observado en los experimentos, donde las condiciones óptimas de operación bimodal en aire se encuentran cuando se maximiza el cociente de amplitudes A_{01}/A_{02} y se maximiza también A_{01} .

3.3.3. Dependencia del efecto bimodal con el factor de calidad.

Para estudiar la dependencia del contraste bimodal con el factor de calidad de ambos modos, se han realizado simulaciones variando Q_1 y Q_2 para una micropalanca que oscila con $A_{01} = 12.9$ nm y $A_{02} = 0.26$ nm. Si se varía Q_2 a Q_1 constante e igual a 160 (figuras 3.11a-b), se observa que el contraste de fase del primer modo permanece constante (esto es un reflejo de que el segundo modo no afecta al primero), mientras que el contraste de fase del segundo modo se incrementa a medida que aumenta Q_2 . Esto es intuitivo si se visualiza que el pico de resonancia es entonces más estrecho y el canal del segundo modo más sensible. Sin embargo, los resultados obtenidos al variar Q_1 manteniendo Q_2 constante e igual a 240 (figuras 3.11c-d) indican que, mientras el contraste de fase del primer modo ahora sí depende del factor calidad, y se incrementa al incrementar Q_1 (de acuerdo con el hecho de que el primer modo aumenta su sensibilidad), el contraste bimodal disminuye a medida que Q_1 aumenta. Estos resultados están de acuerdo con la ecuación del movimiento, donde el hecho de que $A_2 \ll A_1$ produce que el primer modo sea casi independiente del segundo, pero que el segundo no lo sea del primero. El aumento del contraste bimodal a medida que Q_1 disminuye podría ser una consecuencia de la dependencia del contraste bimodal en el cociente de amplitudes libres. Si el contraste bimodal es sensible al cociente entre amplitudes libres A_{01}/A_{02} es lógico pensar que también lo sea al cociente entre amplitudes A_1/A_2 ; de esta forma cuanto menor sea Q_1 , más suavemente disminuye A_1 a medida que z_c disminuye y más alto es el cociente de amplitudes A_1/A_2 .

3.3.4. Optimización de los parámetros en líquido

Al implementar la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos, en muy pocos casos he podido encontrar el rango de operación de A_{01} altas y A_{02} bajas que funcionaba en aire utilizando la microscopía de fuerzas bimodal en régimen atractivo. Esto es consecuencia de la naturaleza de las fuerzas de interacción en el líquido. Por una parte, como se mencionó anteriormente, las fuerzas atractivas están muy apantalladas, lo que hace su magnitud pequeña respecto a las fuerzas repulsivas de contacto. Por otra, la disminución del factor de calidad impide tomar imágenes con una fuerza de interacción pequeña en modulación en amplitud, ya que en el rango donde las fuerzas son pequeñas en magnitud la amplitud no ha disminuido todavía lo suficiente para que la realimentación opere correctamente. Ambos factores contribuyen a que el microscopio opere generalmente en modo repulsivo en líquidos. Por esta razón, para simplificar el problema, en esta sección se estudiará la optimización

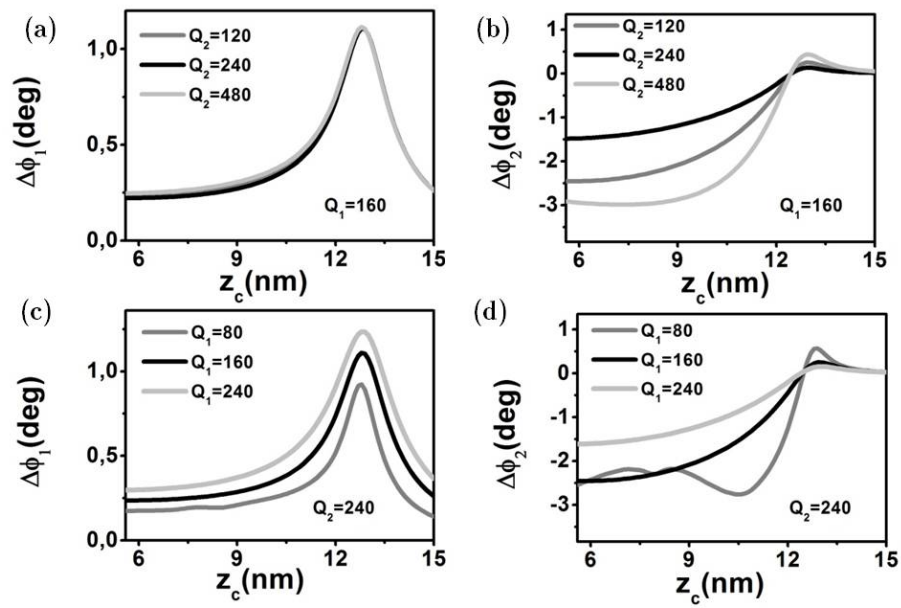


Figura 3.11: Simulaciones en aire para el contraste sobre una muestra de constantes de Hamaker $H_a = 10 \cdot 10^{-20} J$ y $H_b = 12 \cdot 10^{-20} J$ en el canal de fase del (a) primer modo y (b) del segundo modo a medida que Q_2 aumenta manteniendo constante $Q_1 = 160$. Contraste de fase del (c) primer modo y (d) del segundo modo a medida que Q_1 aumenta manteniendo constante $Q_2 = 240$.

de los parámetros utilizados en líquidos mediante simulaciones realizadas en aire en modo repulsivo.

En la figura 3.12a-b se observa el comportamiento del contraste en los canales de fase de ambos modos cuando una micropalanca de $R = 13$ nm, $k_1 = 4$ N/m, $k_2 = 159$ N/m, $f_{01} = 103.8$ kHz, $f_{02} = 650.5$ kHz, $A_{01} = 12.9$ nm y $A_{02} = 0.26$ nm opera en modo repulsivo, se mantiene el factor de calidad del segundo modo constante ($Q_2 = 120$) y se varía el factor de calidad del primer modo ($Q_1 = 40$ y $Q_1 = 160$). En este caso, se utilizaron valores para la constante de Hamaker de un orden de magnitud más bajos, propios del medio líquido ($H = 1.2 \cdot 10^{-20}$ J), de tal forma que la micropalanca opera en modo repulsivo y se calculó el contraste de fase entre dos muestras de módulo de Young efectivo diferentes ($E_a^* = 200$ MPa y $E_b^* = 400$ MPa). En este caso, el comportamiento del contraste del primer modo para ambas Q_1 es muy parecido al del contraste del segundo, no existiendo un incremento significativo del contraste de fase del segundo modo con respecto al del primer modo (lo que denominamos efecto bimodal) en cuanto a sensibilidad se refiere. Si bien es cierto que, incluso si esta ventaja no parece estar presente, aún quedaría el uso del canal de fase del segundo modo como canal válido para proporcionar contraste conservativo sobre la muestra: mientras las fuerzas sean conservativas y se opere en modulación en amplitud, existirá un contraste no disipativo en ϕ_2 en condiciones donde el contraste dado por ϕ_1 es nulo (véanse figuras 3.12c-d) al igual que sucedía en aire (véase figura 3.9).

Existen estudios de microscopía de fuerzas bimodal en régimen repulsivo cuyos resultados están de acuerdo a los resultados presentados en líquidos y que utilizan un cociente de amplitudes libres diferente al que funcionaba correctamente en aire. Por ejemplo, R.W. Stark [146] concluye que la sensibilidad del segundo modo puede verse incrementada haciendo A_{02} mayor, debido a que esto reduce el ruido electrónico. Dietz y colaboradores también presentaron medidas realizadas en régimen repulsivo sobre polímeros [124] en las que optimizaban el contraste bimodal utilizando un cociente de amplitudes libres $A_{01}/A_{02} \approx 5$, bastante menor que el típico de un experimento bimodal en régimen atractivo en aire, donde $A_{01}/A_{02} \approx 20$. Esto puede ser debido a que la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos tiene características diferentes de la microscopía de fuerzas bimodal en aire. En líquidos, no parece existir efecto bimodal, lo que provocaría que el contraste no dependiera del cociente de amplitudes. Sin embargo, un incremento en A_{02} mejoraría la relación señal/ruido en los canales bimodales.

3.4. Conclusiones

La microscopía de fuerzas bimodal es una alternativa a la microscopía de fuerzas convencional. A través de la excitación simultánea de los dos primeros modos flexurales de oscilación de la micropalanca es posible la adquisición de imágenes de alta resolución a una distancia media entre la punta y la muestra grande.

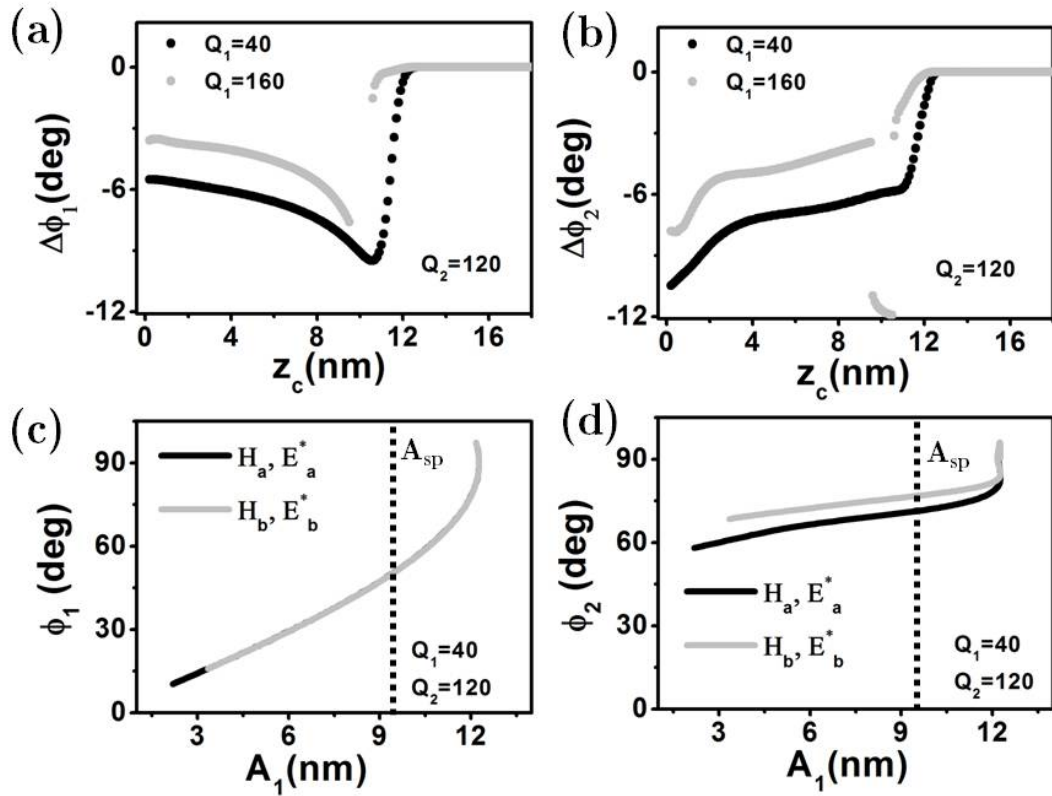


Figura 3.12: Simulaciones para el contraste de fase del (a) primer modo y (b) del segundo modo frente a z_c sobre muestras de $H_a = H_b = 1.2 \cdot 10^{-20}$ J, $E_a^* = 200$ MPa y $E_b^* = 400$ MPa en régimen repulsivo en aire. Comportamiento de (c) ϕ_1 y (d) ϕ_2 frente a A_1 para $Q_1 = 40$ y $Q_2 = 120$ sobre muestras de $H_a = H_b = 1.2 \cdot 10^{-20}$ J, $E_a^* = 200$ MPa y $E_b^* = 400$ MPa en régimen repulsivo en aire. Las líneas discontinuas en (c) y (d) indican el valor de la amplitud de trabajo.

La microscopía de fuerzas bimodal presenta dos ventajas principales. Por una parte, la fase del segundo modo presenta mayor contraste composicional en régimen atractivo que la fase del primer modo. Por otra parte, la fase del segundo modo proporciona una mejora en la resolución lateral con respecto al canal de topografía. Se han obtenidos imágenes de moléculas biológicas de anticuerpos IgG, IgM y de fibras de colágeno en aire con micropalanca de $k_1 \approx 10$ N/m, $Q_1 \approx 160$ y $A_{01} \approx 15 - 20$ nm. Estos parámetros de medida no suponen dificultades adicionales en lo que a la implementación experimental se refiere, ya que las amplitudes libres empleadas son mayores de 10 nm.

Se han analizado los factores que pueden influir en la mejora en la resolución lateral respecto al canal de topografía. Por una parte, el utilizar canales que no están sujetos a realimentación resulta en una disminución del ruido asociado al correspondiente canal. Por otra, se ha encontrado la aparición de lo que hemos denominado efecto bimodal. Este efecto consiste en el incremento drástico del contraste de A_2 y ϕ_2 respecto al contraste de ϕ_1 cuando se aumenta el cociente de amplitudes libres A_{01}/A_{02} . Este efecto también ha sido observado experimentalmente, donde las medidas en el canal bimodal se optimizaban para $A_{01}/A_{02} \approx 20$.

Se ha implementado la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos. Esto proporciona un método para obtener imágenes de alta resolución a una distancia media entre la punta y la muestra grande en el medio natural de las biomoléculas, el líquido. Así, se han tomado imágenes de anticuerpos IgM, de la red de GroEL y de la red atómica de mica en el canal de ϕ_2 con resolución mejorada con respecto a la obtenida en el canal de topografía.

La celda y la punta utilizados son un elemento fundamental para la implementación de la microscopía bimodal en líquidos. Además, es necesario estudiar el espectro de ruido térmico para hallar las frecuencias de oscilación de una micropalanca cuando ésta es excitada acústicamente utilizando una celda comercial.

Se ha observado un comportamiento cualitativamente distinto del efecto bimodal que caracterizaba a la microscopía de fuerzas bimodal en aire. La aparición de fuerzas repulsivas en las medidas en líquidos implica una disminución en el efecto bimodal que motiva un cambio de estrategia en la elección de los parámetros bimodales. En este caso no se ha intentado maximizar el cociente de amplitudes libres ($A_{01}/A_{02} \approx 1 - 5$) sino maximizar A_{02} para que el ruido en el canal del segundo modo disminuya. A pesar de que las medidas en líquidos carecen del efecto de aumento drástico de sensibilidad del canal de ϕ_2 respecto al de ϕ_1 , conservan la otra característica fundamental de la microscopía bimodal: proporcionan un canal adicional que facilita información de la muestra bajo fuerzas conservativas cuando el canales de fase del primer modo ϕ_1 está bloqueado.

Capítulo 4

Implementación de la microscopía de fuerzas bimodal a la medida del módulo de Young efectivo

4.1. Introducción

4.1.1. Fuerzas de contacto

Las fuerzas de contacto aparecen cuando dos cuerpos entran en contacto. Las fuerzas repulsivas de contacto son de naturaleza cuántica y obedecen a la ecuación de Schrödinger. El principio de exclusión de Pauli da lugar a interacciones de canje que mantienen alejados dos electrones del mismo spín entre sí. Estas interacciones son de corto alcance, ya que actúan en un rango de distancias del orden de la distancia interatómica (0.1-0.2 nm). Normalmente se utilizan métodos de primeros principios para determinar la interacción total solucionando el problema a través de un modelo de muchos cuerpos. En particular, la teoría del funcional de la densidad (DFT - density functional theory) [147] consiste en solucionar el problema a través de una minimización de la energía del sistema utilizando funcionales que relacionan la densidad electrónica con la energía del sistema. En algunos casos, la DFT combinada con la aproximación de densidad local (LDA) [148] para la función de intercambio provee un marco para determinar las fuerzas de contacto.

Estas fuerzas de contacto se pueden modelar también a partir de teorías del continuo [19, 149] asumiendo homogeneidad, isotropía y un contacto elástico entre una esfera y un plano que corresponderían al contacto entre punta y muestra. El primer modelo fue desarrollado por Hertz en 1882 [150] (véase figura 4.1a) y supone el contacto entre dos cuerpos elásticos no deformables. En él se desprecia la adhesión entre los cuerpos, por lo que sólo puede ser aplicado cuando la fuerza de adhesión es mucho más pequeña que la fuerza total y no existe deformación plástica. Sin embargo, resultados experimentales sugirieron un área de contacto mayor y cuyo valor no era cero cuando la carga había desaparecido al contrario de lo que

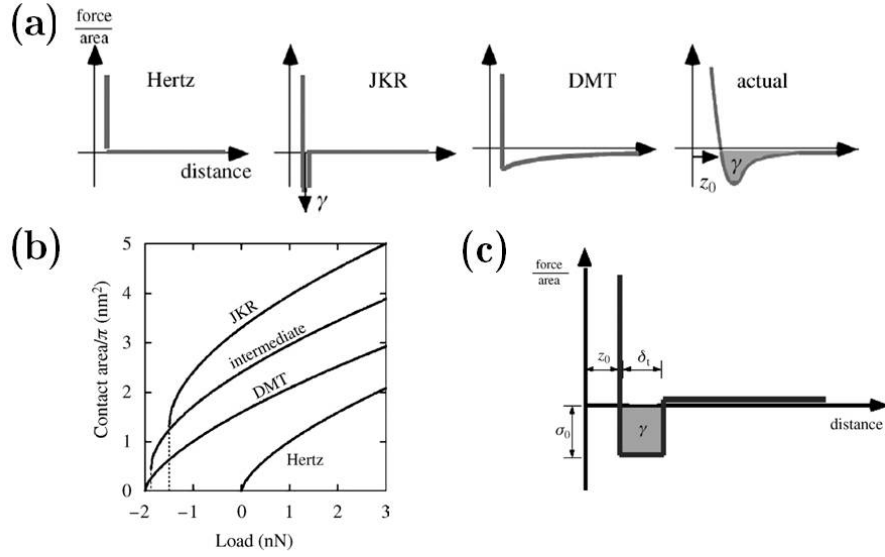


Figura 4.1: (a) Esquema de los modelos de Hertz, JKR, DMT y fuerza real, (b) área de contacto frente a fuerza para cada modelo y (c) Esquema del modelo de Maugis tal y como aparecen en [153].

predecía el modelo de Hertz (véase figura 4.1b), así como una adhesión entre las superficies debido a la existencia de fuerzas atractivas cuando la punta se acerca a la muestra. Esto apuntaba a que la adhesión debía ser considerada [151]. El modelo Johnson-Kendall-Roberts (modelo JKR) [151] asume una adhesión a corto alcance con la forma de una delta de Dirac (véase figura 4.1a) que implica fuerzas de adhesión confinadas dentro del área de contacto, mientras que el modelo Derjaguin-Muller-Toporov (modelo DMT) [152] modela la adhesión en base a fuerzas de largo alcance, donde las fuerzas de contacto son como las del modelo de Hertz y existen además fuerzas atractivas que actúan como una carga adicional. Por su simplicidad de implementación, el modelo DMT es el más extendido en los trabajos relacionados con la microscopía de fuerzas [50, 87].

Sin embargo, el trabajo de adhesión de la fuerza real de interacción no responde a ninguno de estos dos modelos (véase figura 4.1a). Maugis encontró que tanto el modelo JKR como el DMT son límites de la misma teoría descrita con valores diferentes del parámetro de elasticidad λ [154]. El parámetro de elasticidad λ viene dado por:

$$\lambda = \sigma_0 \left(\frac{9R}{2\pi\gamma E^*} \right)^{3/2} \quad (4.1)$$

donde γ es el trabajo de adhesión tal que $\gamma = \sigma_0 \cdot \delta_t$, siendo σ_0 y δ_t la profundidad y anchura del pozo (véase figura 4.1c), R es el radio de la punta, z_0 es la separación de equilibrio y E^* es el módulo de Young efectivo que cumple la relación:

$$\frac{1}{E^*} = \frac{1 - \nu_t^2}{E_t} + \frac{1 - \nu_s^2}{E_s} \quad (4.2)$$

siendo ν_t , ν_s , E_t y E_s los coeficientes de Poisson y módulos de Young de punta y muestra.

De esta forma, cuando las fuerzas de adhesión son de corto alcance comparado con las deformaciones elásticas el modelo JKR habría de ser utilizado (por ejemplo, materiales blandos, grandes radios de contacto y grandes fuerzas de adhesión) y en las condiciones opuestas el modelo DMT habría de ser utilizado (muestras de alta constante elástica, pequeño radio de contacto y pequeñas fuerzas de adhesión). La elección del modelo adecuado es esencial para minimizar el error en la determinación de las propiedades nanomecánicas de una muestra.

Modelo DMT

El único modelo que se utilizará en este capítulo es el modelo DMT, por lo que se introducirá brevemente. La fuerza viene dada por:

$$F_{\text{DMT}}(d) = \begin{cases} \frac{4E^*\sqrt{R}}{3}(a_0 - d)^{3/2} - \frac{HR}{6a_0^2} & d < a_0 \\ -\frac{HR}{6d^2} & d \geq a_0 \end{cases} \quad (4.3)$$

donde H es la constante de acoplo de las fuerzas atractivas (constante de Hamaker) y a_0 es la distancia de equilibrio. La correspondiente fuerza de adhesión viene dada por las fuerzas atractivas evaluadas en a_0 , y se relaciona con la energía superficial γ mediante:

$$F_a = -\frac{HR}{6a_0^2} = 4\pi R\gamma \quad (4.4)$$

4.1.2. Revisión de la literatura

En esta sección se presentará una revisión de los trabajos realizados hasta la fecha en relación a la medida de las fuerzas de contacto utilizando la microscopía de fuerzas.

Nanoindentación

Los experimentos de nanoindentación extraen información de las propiedades nanomecánicas de una muestra a partir de curvas de fuerza en modo estático, en las cuales se registra el comportamiento de la deflexión de la micropalanca al acercarla a la superficie y luego separarla, obteniendo así una curva de la deflexión media z_0 en función de la distancia punta-muestra media z_c . Calculando el promedio en un ciclo de la oscilación en la ecuación 3.4 ($n = 1$) se puede relacionar la deflexión z_0 con la fuerza media de interacción $\langle F_{ts} \rangle$ mediante:

$$\langle F_{ts} \rangle = kz_0 \quad (4.5)$$

La z_c puede ser transformada en indentación d a partir de:

$$d = z_c - z_0 \quad (4.6)$$

Una vez se tiene el comportamiento de la fuerza F_{ts} frente a la distancia d , se puede ajustar el módulo elástico efectivo según el modelo correspondiente dependiendo de los parámetros de la punta y de la muestra. Los inconvenientes principales de este método son su lentitud (la frecuencia característica de aproximación punta-muestra es de 1-2 Hz) y que no es posible controlar la fuerza aplicada sobre la muestra [155].

Modos de contacto

Existen varios métodos basados en la adquisición de curvas de fuerza simultánea a la adquisición de imágenes. El más antiguo es el método de volumen de fuerzas (force volume), que consiste en realizar una curva de fuerza en cada píxel de la imagen manteniendo la fuerza media aplicada constante. A partir del análisis de estas curvas es posible obtener un mapa de constante elástica y otro de adhesión simultáneo con la imagen bidimensional. El inconveniente de este método es su velocidad, ya que si se considera que una curva de fuerzas se toma a una frecuencia típica de 1-2 Hz, un mapa de las fuerzas correspondientes a una imagen completa puede tardar en adquirirse horas. Además, si la imagen se toma con menos píxeles para disminuir el tiempo de adquisición, la resolución lateral que se obtiene es pequeña.

El método de fuerza pulsada (PFM - Pulsed Force Mode) [156] mejoró este inconveniente modulando el piezo en z a una velocidad de (entre 100 Hz y 2 kHz), de tal forma que las propiedades mecánicas se pueden obtener en menos tiempo. La fuerza máxima aplicada se mantiene constante y es del orden de nanonewtons. Recientemente, se ha desarrollado el método de la fuerza máxima (Peak Force), que basado en el modo PFM permite mantener la fuerza máxima en el orden de los piconewtons [157]. Esta precisión se consigue principalmente filtrando los cambios espúreos en la deflexión de la micropalanca que no tienen relación con las fuerzas de interacción.

Por otra parte, el método de modulación en fuerza es una variación del modo contacto que consiste en excitar sinusoidalmente a una frecuencia del orden de kHz la muestra para mantener la deflexión, y así la fuerza media constante. La amplitud de la modulación que ha de ser aplicada para mantener la deflexión constante varía con las propiedades elásticas de la muestra, de tal forma que grabando la deformación se puede obtener un mapa de la diferencia de elasticidades [158, 159, 160, 161].

Por último, existen métodos basados en la combinación de la microscopía de fuerzas con ondas de alta frecuencia [162, 163, 164, 165]. La microscopía de ondas acústica [162] es un método muy extendido. Consiste en generar una función a

frecuencia de megaherzios que atraviesa la muestra y causa vibraciones en ella que se transmiten a la punta de una micropalanca que está en contacto con la superficie de la muestra. A través de la medida de la frecuencia de resonancia de modos de vibración más altos se obtienen cuantitativamente propiedades tanto de los objetos enterrados en la muestra como de los superficiales. Otra de ellas, la microscopía de fuerzas ultrasónica [164] también hace uso de señales a frecuencias altas, esta vez aplicadas a la micropalanca y no a la muestra, para extraer propiedades de forma cuantitativa.

Modos dinámicos

La motivación fundamental de utilizar los modos dinámicos para la estimación cuantitativa de propiedades nanomecánicas reside en que las medidas no sean invasivas, esto es, que no produzcan daños irreversibles sobre la muestra a estudiar y en que su velocidad de los mismos es rápida (igual a la de adquisición de una imagen de topografía). Muchos canales (fase del primer modo, armónicos superiores de la frecuencia de excitación...) están relacionados directamente con las propiedades nanomecánicas de la muestra; la dificultad reside en cuantificar estas propiedades.

Legleiter y colaboradores propusieron un método para reconstruir la fuerza de interacción conocido como microscopía de fuerzas de aceleración (SPAM - scanning probe accelerometer microscopy) [87, 166] que consiste en obtener la fuerza a partir de la aceleración derivando dos veces la deflexión de la micropalanca (véase figura 4.2a-b). Su mayor inconveniente es que el ruido se amplifica al derivar y que para que se pueda obtener una fuerza distinguible es necesario una relación señal/ruido muy alta. Por esta razón las fuerzas de contacto medidas a través del método también fueron muy altas (150-500 nN) [87].

Un enfoque diferente al mismo problema consiste en abordar el sistema de la micropalanca como un sistema lineal e invariante en el tiempo (sistema LTI - linear-time invariant). Esto es, aunque las fuerzas de interacción sean en general no lineales, la micropalanca como sensor se comporta de forma lineal. Stark y colaboradores relacionaron así de forma directa la interacción entre la punta y la muestra con la respuesta de la micropalanca a través de la inversa de la función de transferencia [167]. De esta forma, conociendo la función de transferencia (véase figura 4.2d) y la respuesta en armónicos de la micropalanca (figura 4.2e) es posible reconstruir la fuerza de interacción. El inconveniente de este método es la baja relación señal/ruido de estos armónicos de la frecuencia de excitación. Además, la función de transferencia, al incluir cuatro modos flexurales, es muy dependiente de los parámetros de la micropalanca y de la posición del láser.

En el año 2007, Sahin y colaboradores desarrollaron un método muy elegante y práctico basado en una idea innovadora que permite reconstruir el módulo de Young efectivo superando los dos inconvenientes que había tenido el enfoque basado en el sistema LTI [50]. Por una parte, se superó el problema de la baja relación señal/ruido de los armónicos superiores antes mencionado. Por otra, también se

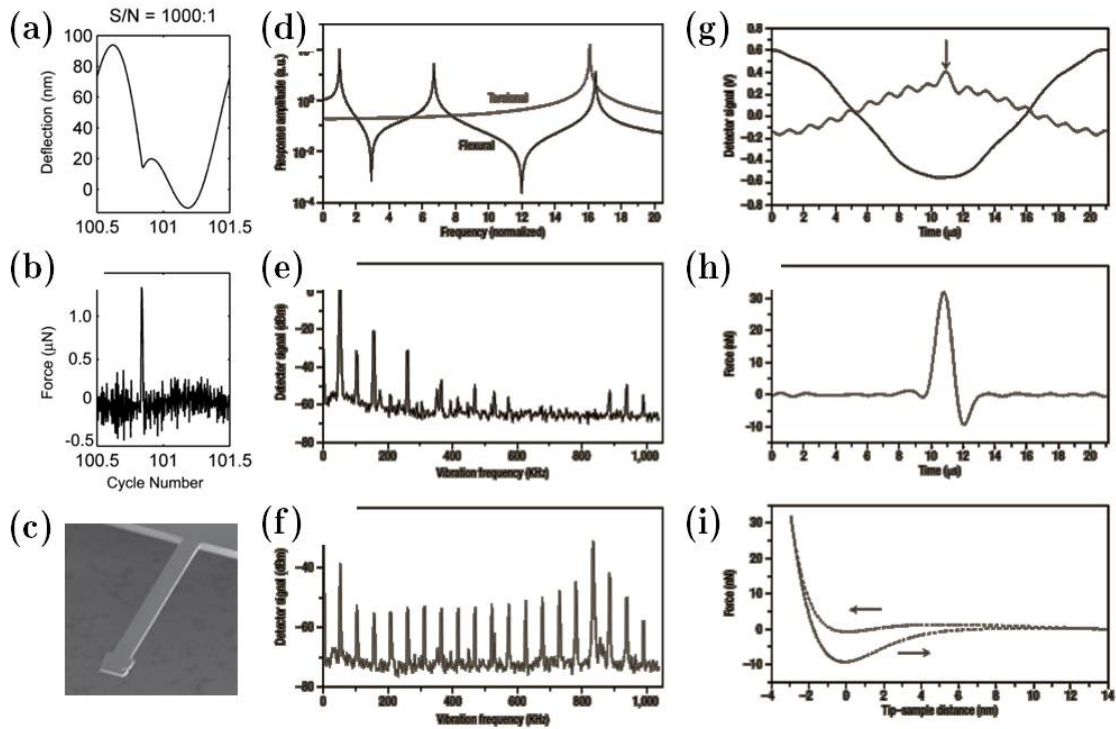


Figura 4.2: (a) Deflexión y (b) fuerza calculada con el método de SPAM [87]. (c) Esquema de una micropalanca torsional (d) Función de transferencia flexural y torsional y correspondientes armónicos (e) flexurales y (f) torsionales, (g) deflexión flexural y lateral y correspondiente fuerza calculada frente (h) al tiempo y (i) a la distancia utilizando el método de Sahin [50].

superó el inconveniente de la fuerte dependencia de la función de transferencia en la forma y tamaño de las micropalanca utilizadas, así como en la posición del láser. El modo en que lo hizo consiste en modificar la micropalanca construyéndola en forma de T y con la punta en uno de sus extremos (torsional harmonic cantilever - THC) (véase figura 4.2c). Esto permite la excitación y respuesta de modos torsionales, con dos ventajas fundamentales respecto a los flexurales. Por una parte, la alta ganancia del modo torsional aumentó la relación señal/ruido de los armónicos de la excitación considerablemente (véase figura 4.2f). Por otra, el primer modo torsional está muy alejado de los modos torsionales superiores y no es necesario tener éstos en cuenta en el cálculo de la función de transferencia, por lo que ésta no depende tan fuertemente de condiciones particulares. De esta forma es posible reconstruir el comportamiento en cada píxel de la fuerza en el tiempo (figura 4.2h). Además, como el primer modo determina el comportamiento de la distancia en el tiempo, esto permite extraer el comportamiento en cada píxel de la fuerza en función de la distancia (véase figura 4.2i) y ajustarlo a la ley de fuerzas más adecuada para así extraer las propiedades mecánicas efectivas. El método se ha conseguido aplicar exitosamente tanto en aire [50] como en líquidos [78, 168, 169] y las aplicaciones sorprenden día a día. En el 2009 se determinó con resolución molecular el módulo de Young efectivo de redes de proteínas sobre mica [78] (véase la figura 1.11 de la página 23) y se detectó la hibridación de ADN con aplicaciones médicas [170]. Recientemente también se ha conseguido medir interacciones anticuerpo-antígeno en tiempo real [171]. El radio de la punta no es conocido generalmente, por lo que se suele calibrar con una muestra de módulo de Young conocido, de tal forma que se obtiene una estimación para el radio de la punta. El valor del radio se utiliza posteriormente para estimar el módulo de Young efectivo sobre muestras con módulo de Young efectivo desconocido [50].

4.1.3. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es la estimación del módulo de Young efectivo de una muestra de forma simultánea a la adquisición de la imagen de topografía. Para ello se utilizará la microscopía de fuerzas bimodal en modulación en frecuencia. Los canales bimodales habían demostrado proporcionar un mapa composicional de la muestra libre de influencias topográficas. En esta ocasión, el objetivo es cuantificar dicho mapa composicional.

Para ello es necesario encontrar una relación entre los canales a los que se tiene acceso a través de los experimentos y la fuerza de interacción. Utilizando algunas aproximaciones teóricas es posible obtener esta relación, y a partir de ella estimar el módulo de Young efectivo de la muestra. En este capítulo se estudia bajo qué condiciones estas aproximaciones son adecuadas y el método es válido.

Finalmente, se presentará una aplicación experimental del método. Se transformarán las imágenes de A_2 y ϕ_2 de una muestra de anticuerpos IgM sobre mica en PBS (Phosphate Buffered Saline - Tampón fosfato salino) en un mapa del módulo de Young efectivo de la muestra. Las condiciones experimentales de la imagen son

tales que la adquisición de imágenes y posterior cuantificación han sido obtenidas con fuerzas de interacción máximas de 40 pN, indispensables para que las medidas sobre el anticuerpo no sean invasivas.

4.2. Experimentos bimodales en modulación en frecuencia

Existen dos motivos por los cuales hemos utilizado la microscopía de fuerzas bimodal en modulación en frecuencia en lugar de utilizarla en modulación de amplitud como habíamos hecho anteriormente [122, 128]. El primero de ellos es que hasta el momento la microscopía de fuerzas bimodal en modulación en frecuencia sólo se había implementado en UHV [126, 127]. En líquidos, el complejo espectro de resonancia de la micropalanca dificulta la excitación y sucesiva auto-realimentación de la micropalanca. El segundo motivo es la minimización de las fuerzas aplicadas. En microscopía de fuerzas modulada en frecuencia y en especial en líquidos, la señal de cambio en la frecuencia de resonancia es más sensible que la señal de amplitud [27]. Esto permite operar la realimentación en un rango de fuerzas en el que la amplitud aún no ha disminuido y sí lo ha hecho la frecuencia de resonancia, lo que posibilita la aplicación de fuerzas muy pequeñas. Bajo estas condiciones la resolución lateral no es grande, puesto que la fuerza varía lentamente a distancias grandes y más bruscamente a medida que nos acercamos a la muestra. Sin embargo, como se mencionó en el capítulo 3, lejos de la muestra la microscopía de fuerzas bimodal produce un aumento de la resolución lateral con respecto a los demás canales. En esta sección presentaré brevemente los resultados experimentales por completitud al resto del capítulo. Los experimentos han sido realizados por David Martínez-Martín y Christian Dietz en el laboratorio del Profesor Julio Gómez Herrero (UAM)[28].

4.2.1. Montaje experimental

El montaje experimental utilizado se muestra en la figura 4.3. En FM-AFM, la excitación de la micropalanca se ajusta a partir de la respuesta para que su desfase sea siempre $\pi/2$, de tal forma que la micropalanca siempre oscile en resonancia. El cambio en la frecuencia de resonancia Δf se utiliza como señal de realimentación. Además, existe una realimentación adicional que mantiene la amplitud constante. Se ha incorporado la microscopía de fuerzas bimodal de forma distinta a la propuesta por otros grupos [126], que también operan el segundo modo en modulación en frecuencia. En nuestro caso, el segundo modo no está sujeto a realimentación, de tal forma que es totalmente libre para registrar cambios en la interacción a través de los canales de A_2 y ϕ_2 .

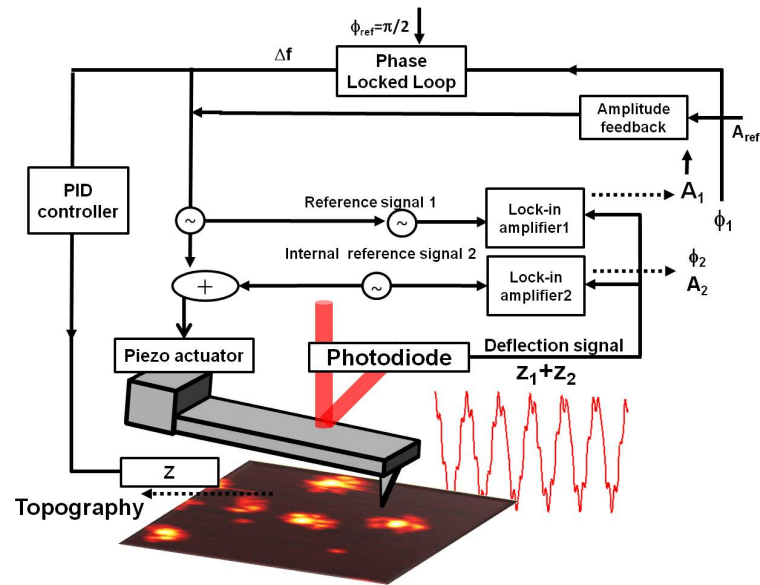


Figura 4.3: Implementación de la microscopía de fuerzas bimodal en modulación en frecuencia. El PLL permite que la señal bimodal se utilice como excitación de la micropalanca autorealimentada. Los lock-in amplifiers extraen la respuesta de la micropalanca a las frecuencias del primer y segundo modo de oscilación flexurales. La realimentación mantiene Δf_1 constante y A_1 constante, mientras que existen tres canales auxiliares disipación Γ y amplitud A_2 y fase ϕ_2 del segundo modo válidos para la adquisición de imágenes.

4.2.2. Resultados experimentales

En los experimentos realizados en colaboración con el grupo del Profesor Julio Gómez Herrero se obtuvieron imágenes de anticuerpos IgM (anteriormente descritos en el capítulo 3) en PBS con resolución molecular y una altura de entre 5 y 6 nm (véase figuras 4.4a-b), próxima a la nominal y a la medida a través de microscopía de fuerzas a bajas temperaturas [141]. El hecho de ser capaces de medir una altura próxima a la nominal es consecuencia de que nuestra medida no es invasiva, esto es, no estamos deformando la proteína. Hasta nuestro conocimiento, no existen medidas similares en la literatura. Los resultados experimentales obtenidos fueron posibles gracias a la combinación de la microscopía de fuerzas bimodal con la microscopía de fuerzas en modulación en frecuencia, unida a una mejora en la celda fluida de tal forma que no existen picos espúreos en el espectro [172]. También se han realizado experimentos de espectroscopía sobre mica y anticuerpo, indispensables para la cuantificación de los resultados. En las figuras 4.4c-f se presenta el comportamiento del cambio en la frecuencia de resonancia Δf , la deflexión media z_0 , y la amplitud y fase de los canales bimodales A_2 y ϕ_2 frente a la distancia punta-muestra media z_c . Los experimentos presentados en la figura 4.4 fueron realizados con una micropalanca de nitruro de silicio triangular con punta de silicio de $k_1 \approx 0.65 \pm 0.1$ N/m, $k_2 \approx 19.3$ N/m, $f_{01} \approx 21.665$ kHz, $f_{02} \approx 116.715$ kHz, $Q_1 \approx 3$ y $Q_2 \approx 5$. Las imágenes fueron adquiridas a una amplitud de oscilación del primer modo constante ($A_1 = 4.5$ nm), un cambio en la frecuencia de resonancia de trabajo $\Delta f \approx 50$ Hz y con una amplitud libre del segundo modo $A_{02} \approx 0.5$ nm.

4.3. Modelo teórico para la reconstrucción del módulo de Young efectivo

El primer paso hacia la reconstrucción del módulo de Young efectivo es encontrar una relación entre la fuerza y los observables. En modulación en frecuencia, cuando la amplitud es más pequeña que la longitud típica de la fuerza se puede relacionar el gradiente de la fuerza directamente con el cambio en la frecuencia de resonancia [173]. Si la amplitud es mayor, como ocurre en los experimentos realizados, el cambio en la frecuencia de resonancia está relacionado con el virial de la fuerza [173, 174]. Por esta razón comenzaré presentando las fórmulas correspondientes al virial y a la energía disipada para FM-AFM.

4.3.1. Fórmulas del virial y de la energía disipada en FM-AFM.

El problema de una micropalanca oscilando se puede resolver, bien a través de una aproximación newtoniana, esto es, resolviendo directamente la ecuación, o planteando el problema desde un punto de vista de cantidades promedio. Esta

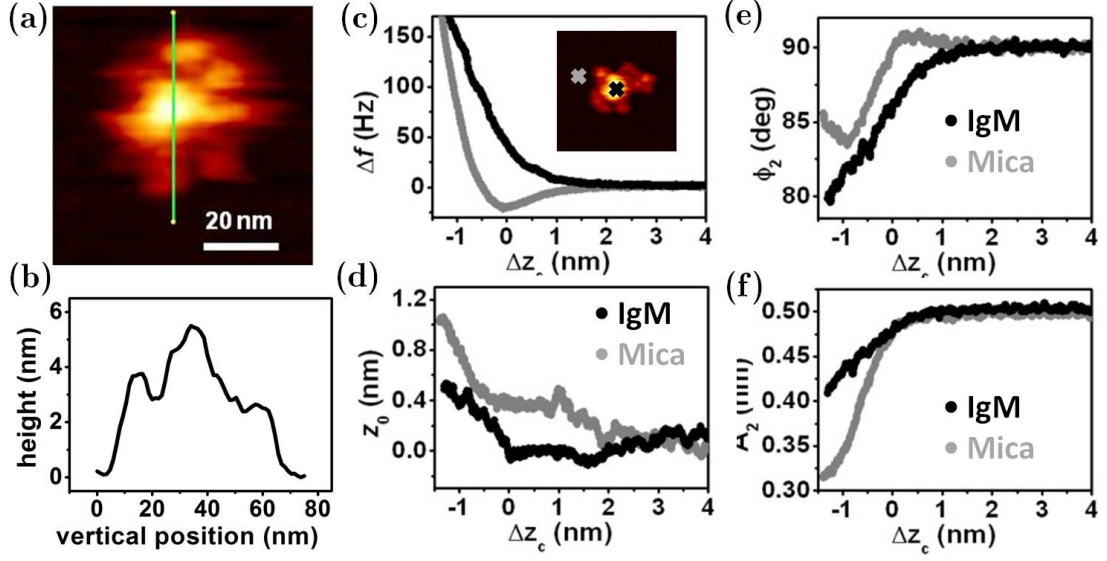


Figura 4.4: (a) Imagen de topografía de un anticuerpo IgM en PBS utilizando la microscopía de fuerzas bimodal en modulación en frecuencia. (b) Perfil correspondiente a la línea verde en (a). La altura es algo menor a 6 nm, próxima a la nominal. Experimentos de espectroscopía correspondientes a (c) cambio en la frecuencia de resonancia, (d) deflexión media, (e) A_2 , y (f) ϕ_2 sobre mica y anticuerpo IgM.

última aproximación permite interpretar los resultados de forma muy clara. Las dos cantidades importantes desde este punto de vista son el virial de la fuerza y la energía disipada [138, 175]. En el modelo de masa puntual, la ecuación de la energía disipada facilitó la interpretación de las imágenes de fase, relacionándolas directamente tanto con la energía disipada por las fuerzas de interacción [135, 176] como con la presencia de armónicos superiores de la frecuencia de excitación de la micropalanca [177]. Unos años más tarde, se propuso la utilización de la ecuación del virial de la fuerza para relacionar de forma analítica la constante de acoplo de la fuerza de Van der Waals (constante de Hamaker) con los parámetros de la micropalanca A_1 , z_c y R [175]. Dado que la micropalanca tiene diversos modos de vibración y al empleo singular del segundo de ellos para la microscopía de fuerzas bimodal, es necesario extender la definición de virial y energía disipada a varios modos [137, 138], de tal forma que el virial y la energía disipada se puedan relacionar con los canales bimodales A_2 y ϕ_2 . El virial de la fuerza y la potencia disipada por cada modo n se definen como:

$$V_{ts,n} = \frac{1}{T} \int_0^T F_{ts}(t) z_n(t) dt \quad (4.7)$$

$$P_{ts,n} = -\frac{1}{T} \int_0^T F_{ts}(t) \dot{z}_n(t) dt \quad (4.8)$$

donde la potencia se relaciona con la energía disipada E_{ts} mediante:

$$P_{ts,n} = \frac{E_{ts,n}}{T} \quad (4.9)$$

y T es el periodo de la oscilación total

$$T = p_1 \frac{2\pi}{\omega_1} = p_2 \frac{2\pi}{\omega_2} \quad (4.10)$$

siendo p_1, p_2 enteros.

Como vimos en el capítulo 3, cuando el microscopio de fuerzas opera en modulación en amplitud, la micropalanca se excita siempre con una amplitud y una frecuencia constantes (véase ecuación 3.6). En modulación en frecuencia, la frecuencia de excitación no es constante. Depende de la respuesta de la micropalanca, puesto que ésta se modifica para luego utilizarla como señal de excitación. Esta modificación consiste en desfazarla de tal forma que, cuando la fuerza de interacción desplaza el pico de resonancia de la micropalanca, ésta continúe oscilando en resonancia. En el caso de operar también a amplitud constante, se ha de introducir también una ganancia que compense la reducción en la amplitud debida a la interacción. Matemáticamente, esto equivale a [26]:

$$F_{exc}(t) = G_n z_n(t - t_{phase}) \quad (4.11)$$

donde G_n es la ganancia necesaria para mantener la amplitud constante y $\frac{1}{t_{phase}} = \frac{3}{4}f$ corresponde a un desfase $\phi = \pi/2$. En estas condiciones, la respuesta estacionaria de cada modo de la micropalanca viene dada por:

$$z_n(t) = A_n \cos(\omega_n t - \phi_n) \quad (4.12)$$

donde $\phi_n = \pi/2$. Combinando las ecuaciones 3.4, 4.7, 4.11 y 4.12 se obtienen las ecuaciones del virial y de la potencia disipada en modulación en frecuencia para cada modo [138]:

$$V_{ts,n} \approx -k_n A_n^2 \frac{\Delta\omega_n}{\omega_n} \quad (4.13)$$

$$P_{ts,n} = -\frac{\omega_n A_n}{2} (G_n + \gamma_n \omega_n) \quad (4.14)$$

donde $n = 1, 2$.

Además, de acuerdo a su definición (ecuación 4.7), el virial del segundo modo viene dado por:

$$V_{ts,2} = \frac{1}{T} \int_0^T F_{ts} \left(z_c + z_0 + \sum_i A_n \cos(\omega_n t - \phi_n) \right) A_2 \cos(\omega_2 t - \phi_2) dt \quad (4.15)$$

Cuando $A_2 \ll A_1$, se puede desarrollar la fuerza de interacción que aparece en la ecuación 4.15 en potencias de $A_2 \cos(\omega_2 t - \phi_2)$ [126]. Además, considerando la contribución del término deflexión z_0 y de los modos mayores que 2 despreciables se tiene:

$$V_{ts,2} = \frac{1}{T} \int_0^T F_{ts} \left(z_c + A_1 \cos(\omega_1 t - \frac{\pi}{2}) \right) A_2 \cos(\omega_2 t - \phi_2) dt \quad (4.16)$$

$$\approx \frac{1}{T} \int_0^T [F_{ts} \left(z_c + A_1 \cos(\omega_1 t - \frac{\pi}{2}) \right) A_2 \cos(\omega_2 t - \phi_2)] \quad (4.17)$$

$$+ \frac{1}{2} F'_{ts} \left(z_c + A_1 \cos(\omega_1 t - \frac{\pi}{2}) \right) A_2^2 \cos^2(\omega_2 t - \phi_2) dt \quad (4.18)$$

Primero se estudiará el caso en el que el segundo modo también está sujeto a realimentación [126], por lo que la fase del segundo modo es en este caso $\phi_2 = -\frac{\pi}{2}$. El término de orden cero se hace cero, mientras que la rápida variación del término de primer orden corresponde a un muestreo denso sobre la oscilación del primer modo y puede ser reformulado en función de los parámetros del primer modo teniendo en cuenta la ecuación 4.10:

$$V_{ts,2} \approx \frac{1}{4\pi} \frac{\omega_1}{p_1} \int_0^{2\pi p_2/\omega_2} F'_{ts} \left(z_c + A_1 \cos(\omega_1 t - \frac{\pi}{2}) \right) A_2^2 \cos^2(\omega_2 t - \phi_2) dt \quad (4.19)$$

$$\approx \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi/\omega_1} F'_{ts} \left(z_c + A_1 \cos(\omega_1 t - \frac{\pi}{2}) \right) A_2^2 \omega_1 dt \quad (4.20)$$

Combinando las ecuaciones 4.13 y 4.20 se obtiene una relación entre los parámetros del segundo modo y el gradiente de la fuerza promediado sobre un ciclo de la oscilación del primer modo:

$$-k_2 \frac{\Delta f_2}{f_2} \approx \frac{1}{4\pi} \int_0^{2\pi/\omega_1} F'_{ts} \left(z_c + A_1 \cos \left(\omega_1 t - \frac{\pi}{2} \right) \right) \omega_1 dt \quad (4.21)$$

donde $f = \omega/2\pi$. Se ha comprobado numéricamente que el comportamiento de esta cantidad frente a la distancia mínima $d_{\min} = z_c + z_0 - A_1 - A_2$ es el mismo que el comportamiento del gradiente de la fuerza máxima frente a la distancia mínima (véase la sección 4.3.2) de acuerdo a lo encontrado por Kawai y colaboradores [126]. Sin embargo, la magnitud del mínimo de esta cantidad es diferente que la del mínimo del gradiente de la fuerza. Además, ambas curvas están desplazadas en el eje x. Si se introduce un factor de corrección C y se desplaza la curva aproximada para que coincida con la correspondiente al gradiente de la fuerza real, los parámetros bimodales en z_c se pueden relacionar con el gradiente de la fuerza máxima mediante la expresión:

$$F'_{ts,peak}(z_c) \approx C \frac{k_2 \Delta f_2(z_c)}{f_2} \quad (4.22)$$

4.3.2. Dependencia de la aproximación con el cociente de amplitudes

En esta sección se discute la validez de la aproximación que relaciona la amplitud A_2 y fase ϕ_2 del segundo modo con el gradiente de la fuerza de interacción máxima (véase ecuación 4.22). Para ello se ha utilizado la fuerza de interacción dada por un potencial de Lennard Jones. Esto permite que el gradiente sea continuo en todo el espacio. La fuerza viene dada por.

$$F_{LJ}(d) = \epsilon\sigma \left(\frac{\sigma^4}{(d-d_0)^6} - \frac{1}{(d-d_0)^2} \right) \quad (4.23)$$

donde ϵ está relacionado con la profundidad del potencial, σ con el alcance de la fuerza y d_0 es la distancia de equilibrio. En la figura 4.5a-b se observa el comportamiento de $F_{LJ}(d)$ y de su derivada con respecto a la distancia para diversos valores del parámetro σ . El parámetro σ controla la distancia a la que ocurre el mínimo y el cociente entre fuerzas atractivas y fuerzas repulsivas. En lo que sigue a continuación se denominará fuerza real a la fuerza simulada utilizando la ecuación 4.23.

Se han calculado de forma numérica las integrales que aparecen tanto en la ecuación del virial del segundo modo (dada por la ecuación 4.16) como en la expresión del virial del segundo modo aproximada (dada por la ecuación 4.20) para una micropalanca de $k_1 = 4$ N/m, $k_2 = 226.8$ N/m, $f_{01} = 103.784$ kHz, $f_{02} = 666.293$ kHz, $Q_1 = 200$, $Q_2 = 240$ y $A_1 = 4$ nm y una fuerza de interacción dada por la ecuación 4.23 con $\epsilon = 3 \cdot 10^{-10}$ J y $\sigma = 0.25$ nm. Estas integrales dan lugar a una magnitud \bar{F} con unidades de gradiente de fuerza (N/m) tal que:

$$\bar{F} = k_2 \frac{\Delta f_2}{f_2} \quad (4.24)$$

Se han comparado los valores de \bar{F} obtenidos con el gradiente de la fuerza real. En la figura 4.5c-f se presenta el comportamiento de estas cantidades normalizadas a sus respectivos mínimos para un cociente de amplitudes A_1/A_2 de 1, 0.1, 0.01 y 0.001 respectivamente. Vemos que para valores del cociente de amplitudes mayores de 100 el gradiente tiene el mismo comportamiento con la distancia que el \bar{F} obtenido a partir de las expresiones de la ecuación 4.16 y de la aproximación dada por 4.20. Además, se observa un desplazamiento en el eje x entre las curvas que se tratará en la sección 4.3.4.

4.3.3. Dependencia del factor de corrección en el cociente de amplitudes

Como se mencionó en la sección 4.3.1, para hacer corresponder la expresión $-k_2 \frac{\Delta f_2}{f_2}$ de la ecuación 4.21 con el gradiente de la fuerza es necesario multiplicar la expresión por un factor de corrección.

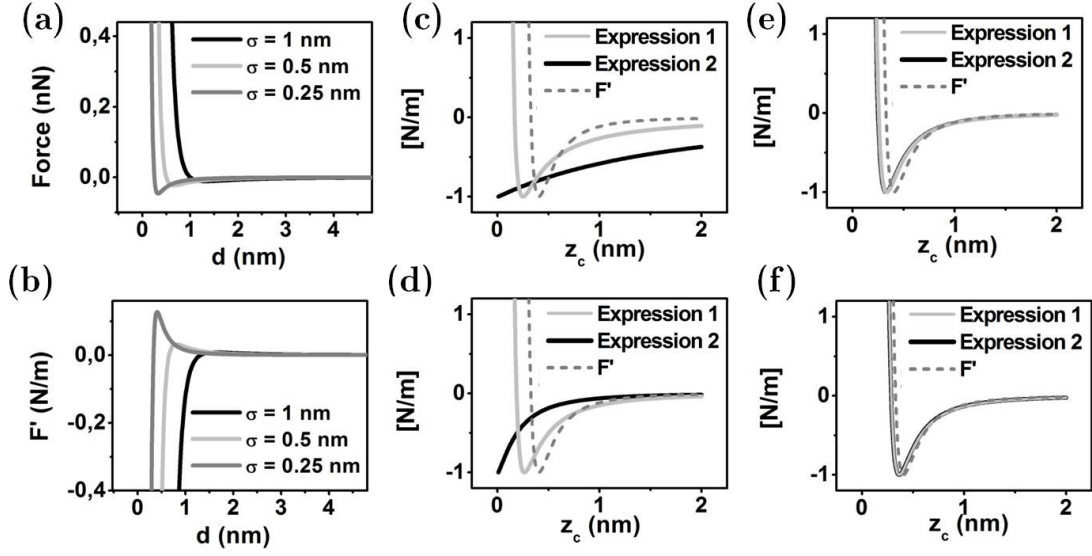


Figura 4.5: Dependencia en σ de la (a) fuerza de Lennard-Jones y (b) de su derivada con respecto a la distancia para un valor de $\epsilon = 3 \cdot 10^{-20}$ J. Comparación entre el gradiente de la fuerza real, y el \bar{F} calculado a partir de la ecuación 4.16 (expresión 1) y 4.20 (expresión 2) para $\sigma = 0.25$ nm y un cociente de amplitudes A_1/A_2 de (c) 1, (d) 0.1, (e) 0.01 y (f) 0.001.

Se ha estudiado la convergencia del factor de corrección para diversos valores de σ y ϵ en la fuerza dada por la ecuación 4.23. En la tabla 4.1 se presentan los factores de corrección obtenidos para las muestras S_1 ($\epsilon = 3 \cdot 10^{-20}$ J, $d_0 = 0$ nm), S_2 ($\epsilon = 10 \cdot 10^{-20}$ J, $\sigma = 2.5$ nm y $d_0 = 0.1$ nm) y S_3 ($\epsilon = 10 \cdot 10^{-20}$ J, $\sigma = 12$ nm y $d_0 = -9$ nm). La muestra S_1 corresponde a un material duro (véase figura 4.5a), las muestras S_2 y S_3 se han intentado ajustar a la ley de fuerzas de un material de 3 GPa y 30 MPa para intentar reproducir las condiciones observadas sobre mica y anticuerpo (véase figura 4.7a)

El factor de corrección C depende del cociente de amplitudes utilizado. Para todos los valores utilizados de ϵ y σ se observa que el factor de corrección converge a

A_1/A_2	1	0.1	0.01	0.001
$S_1, \sigma = 0.25$	1894.310	9.080	8.447	8.452
$S_1, \sigma = 0.5$	237.002	5.897	5.897	5.895
$S_1, \sigma = 1$	29.813	4.059	4.059	4.059
S_2	4.301	2.412	2.412	2.412
S_3	1.179	1.179	1.179	1.179

Tabla 4.1: Factor de corrección para diversos valores de los parámetros ϵ y σ en la ley de fuerzas dada por la ecuación 4.23.

un valor fijo para cocientes de amplitudes libres mayores de 100. Por esta razón, es necesario calibrar el factor de corrección C antes de comenzar a tomar las imágenes.

Para que este método sea válido para la estimación de la constante elástica efectiva de la muestra de forma simultánea a la adquisición de una imagen de topografía, el factor de corrección ha de mantenerse constante a lo largo de la imagen, ya que en la imagen se utilizará el mismo factor de corrección para reconstruir el gradiente de la fuerza sobre una muestra heterogénea.

4.3.4. Dependencia del factor de corrección con la ley de fuerzas

En esta sección se estudiará la diferencia entre los factores de corrección correspondientes a muestras con constantes de acoplo de la ley de fuerzas diferentes. En la figura 4.6a se presenta el comportamiento de las expresiones obtenidas para \bar{F} a partir de la aproximación bimodal para el gradiente de la fuerza dada por la ecuación 4.22 para un cociente de amplitudes de 0.001 junto al gradiente real de la fuerza para muestras del tipo S_1 que modelan materiales duros. Para ello se han utilizado distintos valores del parámetro σ ($\sigma = 1, 0.5, 0.25$ nm). En la figura 4.6a se observa que además de existir una diferencia en el valor del mínimo, también existe un desplazamiento en el eje x de la curva dada por la expresión 4.22 con respecto al gradiente de la fuerza real. Se observa que este desplazamiento depende del valor de σ . Si queremos utilizar las variables bimodales para estimar la constante elástica efectiva mientras se escanea la muestra, el factor de corrección ha de ser único tanto en el eje x como en el eje y. Se ha estudiado el error que resulta de utilizar el factor de corrección correspondiente a $\sigma = 1$, tanto en el eje x como en el eje y, para corregir las curvas de muestras cualquiera que sea su σ . En la figura 4.6b se presentan las correspondientes curvas corregidas. Se observa que existe un error ostensible en utilizar la aproximación propuesta para materiales duros.

Sin embargo, los materiales utilizados en los experimentos no tienen este comportamiento. En la figura 4.7a se presentan las fuerzas correspondientes a un material de módulo de Young efectivo de 3 GPa (muestra S_2) y a uno de 30 MPa (muestra S_3). La figura 4.7 muestra la comparación del gradiente real de la fuerza y del obtenido a partir de la aproximación bimodal (ecuación 4.21) para un cociente de amplitudes A_1/A_2 de 0.001. En las figuras 4.7c-d se muestra lo que ocurre si utilizamos el factor de corrección correspondiente a la muestra S_2 ($C_{S_2} = 2.412$) para corregir ambas curvas. El error debido a aplicar el factor de corrección de la muestra S_2 a la corrección del gradiente de la fuerza sobre la muestra S_1 (esto es, aplicar el doble del factor que le correspondería, puesto que $C_{S_1} = 1.179$) es pequeño debido a que las variaciones en el gradiente de la fuerza sobre la muestra S_3 son pequeñas.

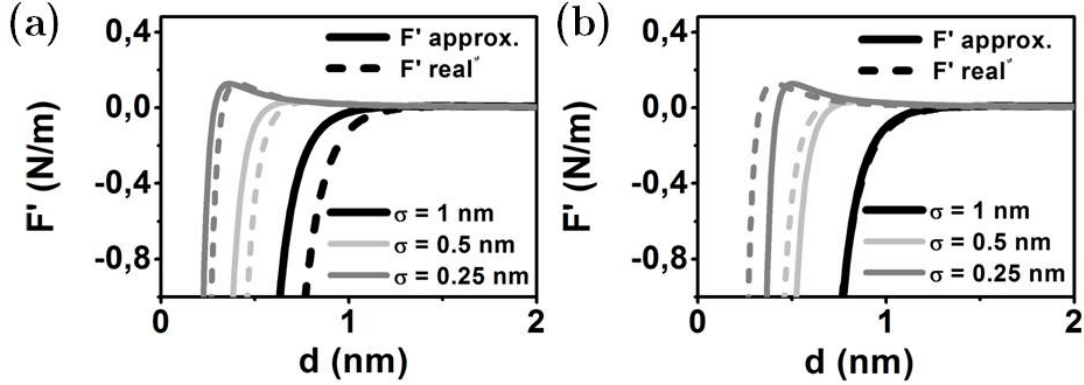


Figura 4.6: (a) comparación del gradiente real de la fuerza y del obtenido a partir de la aproximación bimodal (ecuación 4.21) y (b) comparación del gradiente real de la fuerza y el corregido (ecuación 4.22) a partir del factor de corrección C y del desplazamiento en el origen en la curva correspondiente a $\sigma = 1$.

4.3.5. Fórmulas del virial y de la energía disipada en AM-AFM

Los experimentos realizados sobre moléculas de anticuerpos IgM que en este capítulo se pretenden modelar mantienen el cambio de frecuencia de resonancia del primer modo Δf constante y dejan variar la amplitud A_2 y la fase ϕ_2 del segundo modo [28]. Por esta razón, para escribir las ecuaciones del virial y de la energía disipada correspondientes al segundo modo es preciso realizar algunas modificaciones. La ecuación que rige el movimiento de la micropalanca para el segundo modo no sujeto a realimentación viene dado por la ecuación 3.9. Se tiene entonces que la respuesta estacionaria del segundo modo de la micropalanca se obtiene haciendo $n = 2$ en la ecuación 4.12:

$$z_2(t) = A_2 \cos(\omega_{0,2}t - \phi_2) \quad (4.25)$$

Por otra parte, las ecuaciones que determinan la dinámica de la micropalanca en los experimentos para el primer modo serían las correspondientes a FM-AFM (véase sección 4.3.1).

Combinando las ecuaciones 3.9, 4.7, 4.8 y 4.25 se obtiene la ecuación del virial y de la energía disipada para el segundo modo en AM-AFM:

$$V_{ts,2} = -\frac{A_{02}A_2k_2}{2Q_2} \cos \phi_2 \quad (4.26)$$

$$P_{ts,2} = -\frac{\omega_2k_2A_2}{2Q_2} (A_{02} \sin \phi_2 - A_2) \quad (4.27)$$

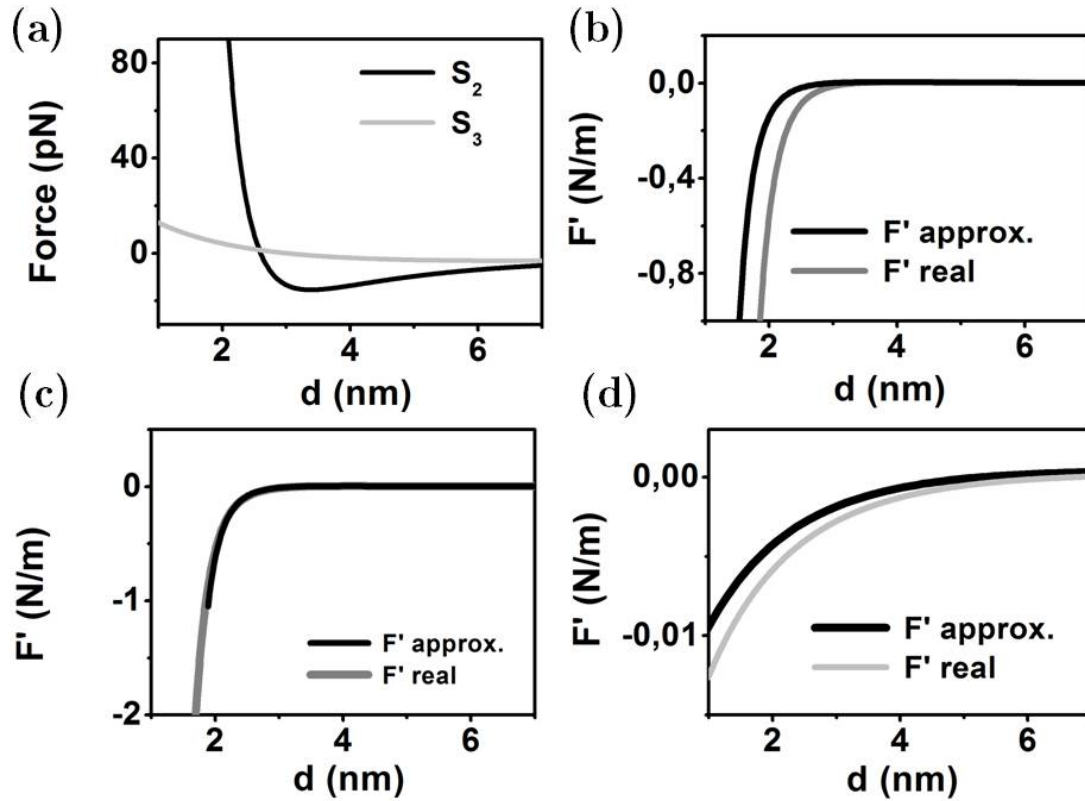


Figura 4.7: (a) Fuerza real (ecuación 4.23) para distintos valores de los parámetro σ y x_c que modelan el comportamiento de un material duro (muestra S_2) y de un material blando (muestra S_3), (b) comparación del gradiente real de la fuerza y del obtenido a partir de la aproximación bimodal (ecuación 4.22) para la muestra S_2 y comparación del gradiente real de la fuerza y del corregido a partir del desplazamiento en la curva correspondiente a la muestra S_2 para las muestras (c) S_2 y (d) S_3 .

Cuando $A_2 \ll A_1$, se pueden realizar las aproximaciones propuestas en la sección 4.3.1 y combinar las ecuaciones 4.20 y 4.26 para obtener una relación entre el gradiente de la fuerza y los canales bimodales A_2 y ϕ_2 :

$$F'_{ts,peak}(z_c) \approx C \frac{A_{02}k_2}{A_2(z_c)Q_2} \cos \phi_2(z_c) \quad (4.28)$$

4.4. Reconstrucción del módulo de Young efectivo a partir de una imagen de AFM

En esta sección se explicará el proceso seguido para estimar el módulo de Young efectivo de una muestra de anticuerpos IgM sobre mica en líquidos a partir de una imagen en los canales de amplitud A_2 y fase ϕ_2 del segundo modo de forma simultánea a la adquisición de una imagen de topografía. La fórmula que relaciona la fuerza máxima con la distancia mínima depende del valor de A_2 y ϕ_2 del segundo modo en z_c y de un factor de corrección C . El factor de corrección C se obtiene comparando el gradiente de la fuerza dado por la aproximación bimodal (ecuación 4.28) con el gradiente de la fuerza reconstruido según el algoritmo de Sader [178]. Por otra parte, se han de registrar los valores de A_2 y ϕ_2 a medida que se toma la imagen de topografía. Se puede entonces obtener un mapa de gradiente fuerza máxima en función de la distancia mínima en cada píxel de la imagen y transformarlo en un mapa de módulo de Young efectivo de la muestra a partir del radio de contacto.

4.4.1. Obtención del factor de corrección experimental

Es posible calcular el factor de corrección a partir de la reconstrucción experimental del comportamiento de la fuerza máxima de interacción frente a la distancia mínima. Para ello se han realizado experimentos de espectroscopía justo antes de comenzar la adquisición de la imagen a estudiar. El procedimiento a seguir será el siguiente. Se intentará comparar el gradiente de la fuerza hallado a partir de la ecuación 4.28 con el gradiente de la fuerza obtenido por un algoritmo de reconstrucción de la fuerza. A partir del comportamiento del cambio en la frecuencia de resonancia Δf frente a z_c (véase figura 4.4c) es posible reconstruir la fuerza de interacción entre la punta y la muestra utilizando el método de Sader [178, 179].

$$F_{ts}(d) = 2k_1 \int_d^\infty \left(\left(1 + \frac{A_1^{1/2}}{8\sqrt{\pi(u-d)}} \right) \Omega_{FM}(u) - \frac{A_1^{3/2}}{2\sqrt{(u-d)}} \frac{d\Omega_{FM}(u)}{du} \right) du \quad (4.29)$$

donde $\Omega_{FM}(u) = \frac{\Delta\omega_1}{\omega_{01}}$ y d es la distancia mínima. El proceso requiere incluir en el cálculo de la distancia mínima d tanto la deflexión z_0 como la amplitud del segundo modo A_2 ($d = z_c - z_0 - A_1 - A_2$) para obtener valores razonables para

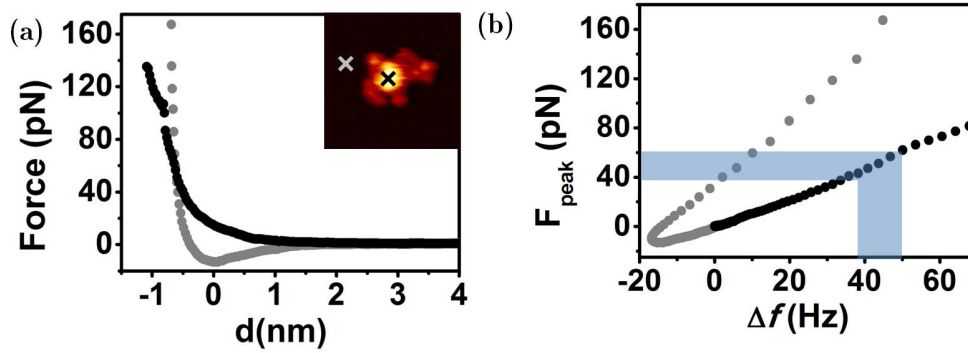


Figura 4.8: (a) Fuerza reconstruida a partir de los datos experimentales sobre IgM y mica utilizando el método de reconstrucción de la fuerza de Sader [178]. (b) Comportamiento de la fuerza máxima frente a Δf hallado a partir de (a) y de los experimentos de espectroscopía. Los experimentos se han realizado con $40 \text{ Hz} < \Delta f < 50 \text{ Hz}$, lo que implica una fuerza máxima aplicada sobre el anticuerpo muy pequeña (entre 40 y 60 pN).

la constante elástica de la mica (véase Apéndice 6.7). La figura 4.8a muestra el comportamiento de la fuerza reconstruida frente a la distancia mínima d .

Para los valores experimentales de la micropalanca utilizada ($k_1 = 0.65 \text{ N/m}$, $k_2 = 19.3 \text{ N/m}$, $f_{01} = 21.665 \text{ kHz}$, $f_{02} = 116.715 \text{ kHz}$, $Q_1 = 3$, $Q_2 = 5$ y $A_1 = 4.5 \text{ nm}$), el método de Sader muestra una reconstrucción de la fuerza acorde a lo esperado. Si se ajusta la parte lineal de la curva correspondiente a la fuerza reconstruida a una recta, se obtiene una constante de fuerzas de $1.60 \pm 0.06 \text{ N/m}$ para la mica y $0.153 \pm 0.004 \text{ N/m}$ para el IgM. La constante elástica obtenida realizando el ajuste sobre la curva correspondiente a la mica es infraestimada porque la indentación es pequeña. Esto coincide con lo observado en la literatura con este tipo de micropalanca [78]. La constante elástica obtenida realizando el ajuste sobre la curva correspondiente al anticuerpo es 10 veces más pequeña que la obtenida sobre la mica, lo que también coincide con lo observado sobre redes bidimensionales de proteínas [78].

Si se combina la gráfica de fuerza máxima frente a distancia mínima con la obtenida a partir de los experimentos de espectroscopía para Δf frente a distancia mínima, se puede estimar la fuerza máxima aplicada para un cambio en la frecuencia de resonancia constante. En particular, las imágenes de anticuerpos IgM en PBS se han adquirido con $\Delta f = 40 - 50 \text{ Hz}$. En este rango de Δf , la fuerza máxima aplicada (véase recuadro azul de la figura 4.8b) es aproximadamente de $40 - 60 \text{ pN}$ sobre IgM y $140 - 180 \text{ pN}$ sobre la mica. El hecho de que la fuerza máxima sobre la mica sea superior a la fuerza máxima sobre el anticuerpo es debido a la presencia de fuerzas atractivas superiores sobre la mica que sobre el anticuerpo. Las fuerzas sobre el anticuerpo son muy pequeñas, lo que explica que la altura medida (5-6 nm) por AFM sea cercana a la altura nominal (7.5 - 8 nm) y corrobora que la medida no es

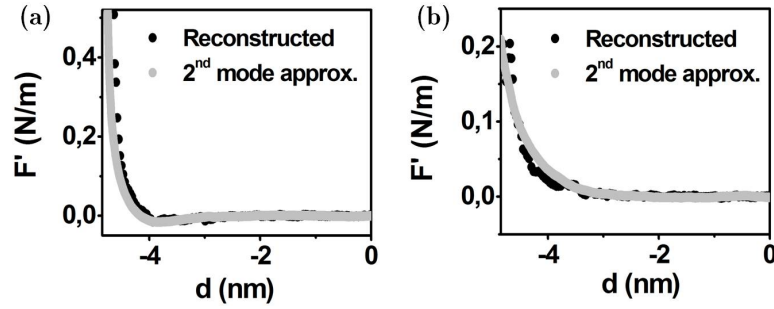


Figura 4.9: Comparación de la fuerza reconstruida según el método de Sader (ecuación 4.29) con la fuerza reconstruida a través de la aproximación bimodal (ecuación 4.28) para (a) mica y (b) IgM.

invasiva.

Igualando el gradiente de la fuerza reconstruida a través del método de Sader con el obtenido a través de la aproximación del segundo modo (ecuación 4.28) se obtiene un factor de corrección de $C = 0.389$ y un desplazamiento en x nulo. Los valores de A_2 utilizados en 4.28 se han corregido respecto a los presentados en la figura 4.4f teniendo en cuenta la vibración residual de la base cuando se excita la micropalanca acústicamente [109]. La figura 4.9 muestra las curvas correspondientes a mica y anticuerpo corregidas utilizando el factor de corrección hallado a partir de las curvas correspondientes a la mica. En este caso se observa que el gradiente de la fuerza reconstruido a partir de la aproximación bimodal sobre el anticuerpo coincide en gran medida con el reconstruido a partir del método de Sader. La pequeña desviación que se observa no es significativa debido a que las variaciones en el gradiente de la fuerza sobre el anticuerpo no son grandes. Se puede concluir que el factor de corrección hallado se puede utilizar para reconstruir el módulo de Young efectivo de la imagen correctamente.

4.4.2. Reconstrucción del módulo de Young efectivo de la imagen

Una vez obtenido el factor de corrección, debemos convertir el mapa del gradiente de la fuerza F' en un mapa de módulos de Young efectivos E^* . Para ello supondremos que la ley de fuerzas es como la del modelo DMT (ecuación 4.3). Los experimentos fueron realizados en PBS, donde las fuerzas atractivas están muy apantalladas, de tal forma que se pueden despreciar. Derivando la ecuación 4.3 y evaluando $F'(d)$ en la distancia mínima se obtiene una relación entre el módulo de Young efectivo y el gradiente de la fuerza máxima de interacción:

$$F'_{\text{peak}}(d_{\text{min}}) = 2E^* \sqrt{R} \sqrt{(a_0 - d_{\text{peak}})} = 2E^* a \quad (4.30)$$

donde a es el radio de contacto. Hemos estimado un radio de contacto de 1 nm para el anticuerpo a partir de la resolución lateral observada en la imagen.

En la figura 4.10a-b se muestra la imagen de topografía junto con el correspondiente mapa de módulo de Young reducido hallado a partir de las imágenes de A_2 y ϕ_2 utilizando las ecuaciones 4.28 y 4.30 y el factor de corrección experimental ($C = 0.388$). Los correspondientes perfiles a lo largo de las líneas punteadas en las figuras 4.10a-c no muestran correlación alguna entre la altura del anticuerpo y sus propiedades elásticas. Mientras que la topografía tiene su máximo en el centro del anticuerpo, el mapa de flexibilidad muestra un máximo de 19.0 ± 0.1 MPa y varios mínimos de 8.2 ± 0.1 MPa a lo largo del perfil. Es ilustrativo comparar la imagen obtenida con la estructura de la proteína (figura 4.10c,e). En primer lugar, se observa que en la zona central del anticuerpo la presencia de una zona con mayor E^* ($E^* \approx 12$ MPa). Esto puede ser debido al hecho de que ahí coincide la cadena J y varias cadenas pesadas pertenecientes a los fragmentos F_c . También se observan otras zonas de mayor módulo de Young efectivo ($E^* \approx 8 - 16$ MPa) que corresponden a la unión de los brazos F_{ab} con el F_c y están indicados por la letra H en la figura 4.10c. Los valores obtenidos para el módulo de Young efectivo sobre el anticuerpo son comparables con los obtenidos para la membrana púrpura [78]. Sin embargo, los valores del módulo de Young efectivo obtenidos sobre la mica son mucho menores de lo esperado. Esto es debido a que la imagen de A_2 utilizada para estimar el gradiente de la fuerza no proporciona apenas contraste. Esto se ha observado también en algunos de los experimentos realizados correspondientes al capítulo 3. En el futuro sería adecuado realizar un estudio sistemático de las condiciones bajo las cuales se mide contraste en los canales A_2 y ϕ_2 o únicamente en uno de ellos. La obtención de contraste bimodal en ambos canales es esencial para la cuantificación de los resultados experimentales.

4.5. Conclusiones

La microscopía de fuerzas bimodal es capaz de proporcionar una imagen de la flexibilidad de una proteína de forma simultánea a la adquisición de una imagen de topografía. Esto se consigue combinando un montaje experimental que permite la aplicación de fuerzas muy pequeñas ($F_{\text{peak}} \approx 50$ pN) con un desarrollo teórico que relaciona el gradiente de la fuerza con la amplitud A_2 y la fase ϕ_2 del segundo modo.

A través de un planteamiento del problema basado en cantidades promedio (virial y energía disipada) es posible relacionar el virial del segundo modo de oscilación con el gradiente de la fuerza de oscilación promediado en un ciclo de la oscilación del primer modo. Las simulaciones numéricas muestran que el comportamiento de estas cantidades promedio con la distancia mínima es el mismo que el comportamiento del gradiente de la fuerza real con la distancia.

Se ha propuesto un factor de corrección que dé cuenta de la diferencia en magnitud de esta cantidad y se ha estudiado el comportamiento de este factor con

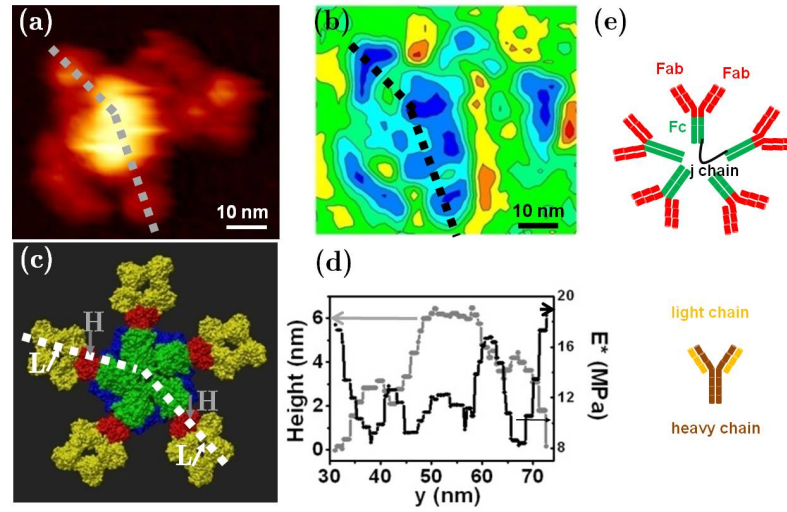


Figura 4.10: (a) Imagen de topografía y (b) mapa de elasticidad de un anticuerpo IgM sobre mica. (c) Modelo del anticuerpo tal y como aparece en [141] (d) Correspondientes perfiles de topografía y módulo de Young reducido a lo largo de la línea punteada en (a)-(c). (e) Esquema del anticuerpo IgM, constituido por la cadena j y cinco anticuerpos IgG, que a su vez están formados por dos cadenas pesadas y dos débiles que se estructuran en dos fragmentos Fab y un fragmento Fc.

la ley de fuerzas. Para materiales duros, la aproximación no es válida debido a que la abrupta dependencia de la fuerza repulsiva de contacto con la distancia amplifica los errores y no proporciona estimaciones correctas de la elasticidad. Sin embargo, para materiales blandos los errores no son significativos y la aproximación es correcta.

Para aplicar el método de reconstrucción de la flexibilidad de forma experimental se han llevado a cabo experimentos de espectroscopía con el objetivo de comparar el valor de la fuerza reconstruida según las aproximaciones de la microscopía de fuerzas bimodal con el valor de la fuerza reconstruida mediante el algoritmo de Sader. Esto permite la estimación del factor de corrección necesario para reconstruir el gradiente de la fuerza a través de A_2 y ϕ_2 .

La microscopía de fuerzas en modulación en frecuencia permite la reconstrucción de la flexibilidad en la imagen bajo la aplicación de fuerzas muy pequeñas. La fuerza máxima aplicada sobre el anticuerpo es de 50 pN, lo que justifica la medida como no invasiva y es la razón por la que la altura del anticuerpo en la imagen es próxima a la nominal.

No hay correlación alguna entre el módulo de Young efectivo y la topografía del anticuerpo. Mientras que la región central del anticuerpo está elevada con respecto a la región exterior, la flexibilidad del anticuerpo cambia independientemente de su altura. Sin embargo, se observan correspondencias entre la flexibilidad y la estructura del anticuerpo. Se observa una zona de módulo de Young efectivo alto en la región central debido a la presencia de la cadena J y de la unión de los fragmentos Fab

($E^* = 12$ MPa). Además, existen otras regiones con flexibilidad también alta que corresponden a las zonas donde los fragmentos F_{ab} y F_c de cada brazo se unen ($E^* = 8 - 16$ MPa). Los valores obtenidos del módulo de Young efectivo del anticuerpo están de acuerdo a lo encontrado en la bibliografía en relación al módulo de Young efectivo de proteínas.

Capítulo 5

Generación de armónicos superiores en medios de factor de calidad bajo

5.1. Introducción

Cuando la micropalanca de un microscopio de fuerzas oscila en líquidos surgen nuevos fenómenos relacionados con la dinámica debido a la influencia del medio líquido. Aparte del aumento en las fuerzas hidrodinámicas a causa del aumento en la densidad y viscosidad del fluido y que ya fueron vistas en el capítulo 2, surgen nuevos fenómenos no observados anteriormente en microscopía de fuerzas en aire. La motivación del trabajo que presento en este capítulo es entender las características de estos fenómenos y su dependencia en diversos parámetros de la micropalanca. Las fuerzas de interacción que originan estos nuevos fenómenos son fuerzas que dependen de forma no lineal con la distancia. Estas fuerzas distorsionan la oscilación de la micropalanca al mismo tiempo que la fuerza de excitación mantiene periódica la oscilación. Cuando la micropalanca oscila en líquidos, esta generación de armónicos superiores de la frecuencia de excitación abre canales adicionales (amplitudes de estos armónicos) de los que se puede extraer información importante sobre las propiedades de la muestra. La generación de armónicos superiores de la frecuencia de excitación tiene también implicaciones importantes en el contraste de fase y en el cálculo de parámetros esenciales de la interacción.

5.1.1. Fuerzas lineales y fuerzas no lineales

Las fuerzas de interacción entre punta y muestra dependen generalmente de forma no lineal de la distancia [19]. En el caso en el que la amplitud libre A_0 es mucho más pequeña que la longitud característica de la fuerza considerada es posible linearizar la fuerza, de forma que:

$$F_{ts}(z + z_0) = F_{ts}(z_0) + \frac{dF_{ts}}{dz}z \quad (5.1)$$

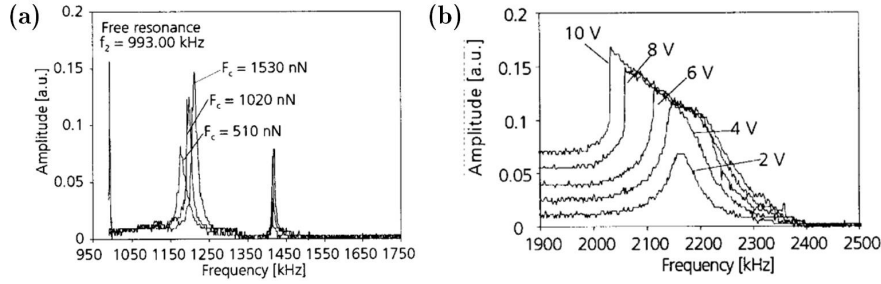


Figura 5.1: curva de resonancia para una (a) fuerza lineal y (b) no lineal tal y como aparece en [183].

donde $k_{ts} = -\frac{dF_{ts}}{dz}$, de tal forma que $F_{ts} = k_{ts}z$ en la ecuación 3.4 ($n = 1$). Esto es posible por ejemplo, en los casos de medidas de capas de solvatación ($A_0 \approx 80$ pm) [11, 103] o en el caso de la medida de fuerzas magnéticas en lift mode [180].

De esta forma, la amplitud resultante viene dada por:

$$A = \frac{kA_0}{\sqrt{(k + k_{ts})^2 \left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q}\right)^2}} \quad (5.2)$$

$$\phi = \arctan \left(-\frac{\omega\omega_0}{Q(k + k_{ts}) \left(1 - \frac{\omega^2}{\omega_0^2}\right)} \right) \quad (5.3)$$

Las ecuaciones 5.2 y 5.3 indican que la presencia de una fuerza de interacción lineal provoca únicamente un desplazamiento en la frecuencia de resonancia de la curva de resonancia (véase figura 5.1a). Este desplazamiento viene dado por [181, 182]:

$$\Delta f = f_0 \frac{k_{ts}}{2k} \quad (5.4)$$

Sin embargo, en la mayor parte de los experimentos de microscopía de fuerzas se observa una deformación de la curva de resonancia como la que se muestra en la figura 5.1b. Ésta deformación puede ser causada bien por una fuerza no lineal, o por una fuerza que entra únicamente en una parte del ciclo [183, 184, 185].

Además, es conocido que la no linealidad en la fuerza de interacción (cuadrática, cúbica, racional...) es la responsable de la generación de armónicos de la frecuencia de excitación [186]. Por ello es preciso incluir fuerzas no lineales en la ecuación del movimiento y estudiar por otra parte si también la fuerza de interacción ha de ser considerada como una fuerza que entra en todo el ciclo o sólo en una parte.

5.1.2. Revisión de la literatura.

El estudio de la generación de armónicos superiores en la microscopía de fuerzas data del año 1999. Var noort y colaboradores [187] utilizaron la amplitud del segundo armónico para medir la densidad de carga superficial de mica y ADN. También en el año 1999, J. Tamayo relacionó la distorsión armónica de la señal con la energía disipada, la amplitud y la fase del armónico fundamental [177]. La distorsión armónica se define como una medida de la fracción de potencia transferida desde el armónico fundamental a armónicos superiores [188]. Numerosos estudios fueron llevados a cabo alrededor del año 2000 en relación a este fenómeno [116, 129, 188, 189].

En particular, Stark y Heckl describieron de forma teórica el origen de esta distorsión considerando que la micropalanca es un sistema lineal descrito por una función de transferencia. De esta forma, bajo una hipótesis fenomenológica para el comportamiento temporal de la fuerza de interacción, llegaron a una relación entre la amplitud de los armónicos superiores y parámetros característicos de la interacción como la fuerza máxima aplicada F_{peak} y el tiempo de contacto t_c [116]. Tres años después, también encontraron que para determinadas condiciones de trabajo se obtenía un contraste apreciable en la amplitud de los armónicos superiores A_n para un contraste de fase nulo [129]. En particular, cuando la amplitud de trabajo A_{sp} era entre un 40 y un 80 % de la amplitud libre, los canales A_n abrían canales alternativos en los que se podía obtener una imagen de la que extraer información composicional de la muestra.

En el año 2005 se observó que la presencia de fuerzas no lineales en la fuerza de interacción entre la punta y la muestra, además de modificar la amplitud y fase del primer armónico y de generar armónicos superiores, también hacía aparecer una deflexión estática z_0 [190]. Por su parte, Atalar y colaboradores también estudiaron propiedades de estos armónicos a través de simulaciones numéricas y aproximaciones analíticas. Sin embargo, se centraron en la respuesta armónica resonante [191], consistente en sintonizaron las propiedades de la micropalanca para que los armónicos superiores de la frecuencia de excitación coincidieran con modos superiores de vibración de la micropalanca y se vieran así amplificados. Con esta técnica, sintonizando la constante de fuerzas de la micropalanca utilizada para así obtener imágenes sobre muestras cualquiera que fuera su constante elástica (tanto muestras biológicas como semiconductores).

La generación de armónicos superiores de la frecuencia de excitación no se limita exclusivamente a la adquisición de imágenes, sino que existen otras aplicaciones muy interesantes. Existen trabajos teóricos que sugieren la utilización de armónicos superiores para la reconstrucción de la fuerza de interacción. En el año 2000 Dürig propuso el estudio de los armónicos generados para reconstruir la fuerza de interacción en microscopía de fuerzas en modulación en frecuencia [133]. También es posible hacerlo en modulación en amplitud, donde simulaciones numéricas muestran que el máximo error en la reconstrucción de la constante elástica de una muestra es de menos del 10 % si se incluyen los primeros 20 armónicos en el cálculo [192].

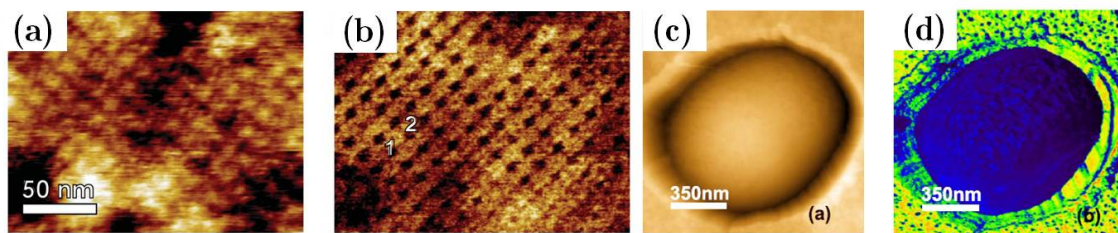


Figura 5.2: Imágenes de (a) topografía y (b) A_2 de una membrana de proteínas tal y como aparece en [51]. Imágenes de (c) topografía y (d) A_2 de una bacteria tal y como aparece en [131].

Las medidas experimentales más exitosas vinieron más tarde. Aunque Stark y Heckl ya habían presentado imágenes que mostraban la posibilidad de utilizar estos canales para examinar la muestra, no ha sido hasta recientemente cuando esto se ha explotado. La razón es que la aplicación tiene su potencia máxima al aplicarla a la relativamente nueva microscopía de fuerzas en líquidos, donde es posible obtener imágenes en armónicos superiores utilizando una amplitud de trabajo $A_{sp} > 0.8A_{01}$ a diferencia de lo que ocurría en aire [87]. Así, se han obtenido imágenes con resolución molecular en líquidos de redes bidimensionales de proteínas y de bacterias que apuntan a un aumento de la resolución lateral [51] y a un contraste composicional [131] no observados en aire hasta la fecha. Los canales adicionales que se abren también pueden ser utilizados para introducir mejoras en la microscopía de fuerzas en líquidos. Por ejemplo, Guckenberger y colaboradores utilizaron la amplitud del segundo armónico como señal de realimentación adicional para la adquisición de imágenes de forma estable en líquidos [130].

5.1.3. Objetivos

El objetivo principal de este capítulo es estudiar la generación de armónicos superiores y su dependencia en diversos parámetros de la micropalanca y en particular, en su factor de calidad. La adquisición de imágenes en armónicos superiores se obtiene mucho más fácilmente en líquidos que en aire como se desprende de las medidas experimentales. La razón por la que esto ocurre parece ser una suma de circunstancias que en este capítulo se intentará analizar en detalle. Para comparar el medio líquido y el aire únicamente se variará el factor de calidad del medio ($Q = 4$ para agua y $Q = 100$ para aire). De sobra es conocido que al pasar de un medio a otro también cambian las fuerzas de interacción [19] y la frecuencia de resonancia [81], pero en lo que se refiere a este capítulo esos parámetros se mantendrán constantes. La apertura de canales en armónicos superiores provoca la apertura también del canal de fase como canal adicional del que obtener información de la muestra [177].

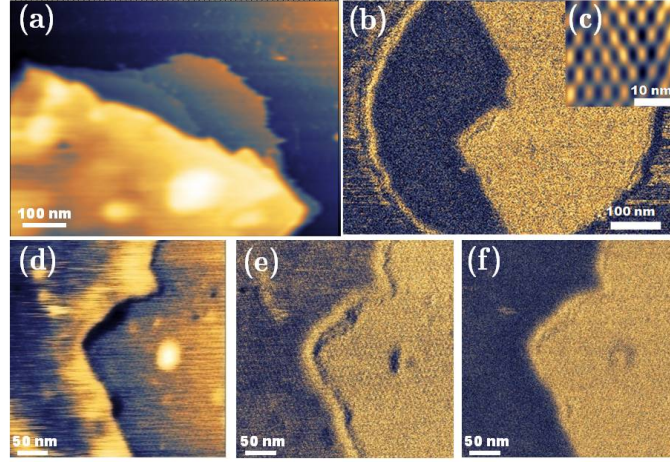


Figura 5.3: Imágenes de (a) topografía y (b) A_2 de una isla de membrana púrpura (bR) sobre mica en buffer. Imágenes de (d) topografía (e) ϕ y (f) A_2 que muestra el contraste composicional que proporcionan ϕ_1 y A_2 entre la superficie extracelular y la citoplasmática de la membrana.

Una imagen ilustrativa de lo que ocurre en líquidos y de lo que se tratará de analizar en este capítulo está representada en la figura 5.3. La muestra elegida para estos experimentos ha sido la red bidimensional que la proteína bR forma en mica (que ya apareció en el capítulo 1). La razón de elegir la membrana púrpura para realizar los experimentos de este capítulo es que tiene dos superficies (extracelular y citoplasmática) con diferentes propiedades mecánicas que pueden dar lugar a un contraste bien diferenciado.

Para la preparación de la muestra se disolvió la proteína bR hasta obtener una concentración homogénea de $5 - 10 \mu\text{g/ml}$ en buffer de pH 8.2 preparado con 30mM de Tris-HCl y 300mM KCl. Luego se incubó sobre la mica durante 50-60 minutos y se enjuagó la muestra con buffer de pH 8.1 preparado con 10mM de Tris-HCl y 300mM KCl. Para la adquisición de las imágenes la muestra y la micropalanca fueron sumergidas en aproximadamente $60 \mu\text{l}$ de este mismo buffer.

Las micropalancas utilizadas son micropalancas triangulares Olympus de constante de fuerzas $k \approx 0.57 \text{ N/m}$ y $f_0 \approx 22 \text{ kHz}$ en líquidos. La figura 5.3a muestra la parte extracelular de la membrana en el canal de topografía utilizando una amplitud libre $A_0 = 5 \text{ nm}$ y una amplitud de trabajo $A_{sp} = 0.97A_0$. La figura 5.3b muestra una región de la parte extracelular y otra región de la parte citoplasmática de la membrana en el canal de fase ϕ . Las figuras 5.3d-f corresponden a una imagen con un rango de barrido menor, donde se observan ambas regiones en los canales de topografía, fase ϕ y amplitud del segundo armónico A_2 . Es importante no confundir A_2 y ϕ_2 en este capítulo, que corresponden a la amplitud y fase del segundo armónico $\omega = 2\omega_0$, con el A_2 y ϕ_2 que aparecieron en capítulos anteriores y que correspondían a la amplitud y fase del segundo modo de oscilación flexural de la micropalanca. Las

imágenes de la figura 5.3 sugieren la apertura de varios canales para proporcionar información adicional acerca del contraste composicional de la muestra. El recuadro de la figura 5.3c muestra una imagen de la periodicidad que los trímeros de la proteína adquieren dentro del cristal y corrobora que la adquisición de imágenes en armónicos superiores es compatible con la adquisición de imágenes de alta resolución en líquidos.

En este capítulo también se estudiarán las ventajas de adquirir imágenes en líquidos en armónicos superiores con respecto al aire y se analizarán los motivos de las mismas.

5.2. Simulaciones numéricas

En esta sección se realizarán simulaciones numéricas utilizando la ecuación del movimiento del modelo de masa puntual, esto es, sin incluir la contribución de modos superiores de vibración de la micropalanca. Además, se considerará el caso en el que la micropalanca se excita magnéticamente (ecuación 2.63). Es conocido que la existencia de modos superiores de vibración de la micropalanca cambia la función de transferencia de la misma, modificando así su respuesta en armónicos de la frecuencia de oscilación [53, 193, 194]. La oscilación de la micropalanca viene entonces dada por:

$$z(t) = z_0 + \sum_n z_n = z_0 + \sum_n A_n \cos(n\omega - \phi_n) \quad (5.5)$$

donde z_0 es la deflexión, z_n la contribución de cada término, ω la frecuencia de oscilación del armónico fundamental y A_n y ϕ_n las amplitudes y fases de los armónicos superiores.

Bajo algunas condiciones (constante de fuerzas $k < 0.1$ N/m y amplitudes libres $A_0 \approx 15$ nm) se ha comprobado experimentalmente que el contraste en la imagen del sexto armónico (cercano al segundo modo flexural de oscilación de la micropalanca) es mucho mayor que la del segundo armónico. Sin embargo, en las condiciones estudiadas en este capítulo, tanto desde el punto de vista experimental como en las simulaciones, las amplitudes libre son más pequeñas ($A_0 \approx 4 - 10$ nm) y la constante de fuerza más grande ($k \approx 0.5 - 4$ N/m), por lo que la excitación momentánea del segundo modo no es significativa [53]. En cualquier caso, sólo será analizado el comportamiento de los cuatro primeros armónicos, que sólo se verían afectados por el primer modo flexural. Esta aproximación es válida para resolver el objetivo de este capítulo, esto es, explicar la dependencia de la amplitud de los armónicos superiores con el factor de calidad.

A continuación se presenta lo más destacado de los resultados obtenidos tras haber realizado simulaciones numéricas para una micropalanca de $k = 4$ N/m, $f_0 = 103.784$ kHz inmersa en medios de factor de calidad $Q = 4$ y $Q = 100$. El modelo utilizado para la fuerza de interacción es el modelo DMT (ecuación 4.3) con $H =$

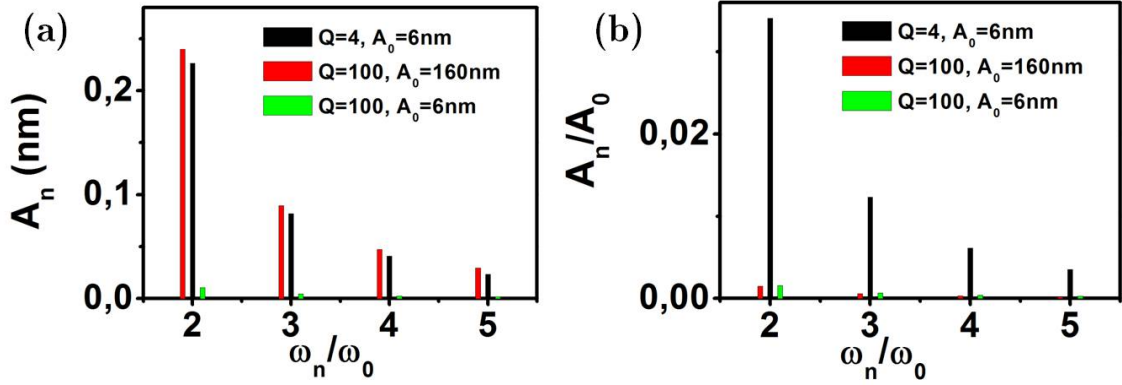


Figura 5.4: (a) A_n y (b) A_n/A_0 para $Q = 100$ y $Q = 4$ para F_0 constante (líneas negra y roja) y para A_0 constante (líneas negra y verde) para una micropalanca de $k = 4 \text{ N/m}$, $f_0 = 103.784$ y $A_{sp} = 0.8A_0$.

$0.2 \cdot 10^{-20} \text{ J}$ y $E^* = 32 \text{ GPa}$. Las simulaciones se han realizado fijando un valor para la amplitud de trabajo ($A_{sp} = 0.9A_0$) y manteniendo dos variables constantes: fuerza de excitación F_0 y amplitud libre A_0 .

5.2.1. Distorsión armónica de la señal

En la figura 5.4a se observa que existen determinadas condiciones ($\omega = \omega_0$ y F_0 , $A_{sp} = 0.9A_0$ constantes) bajo las que la magnitud de los armónicos superiores es igual para $Q = 4$ que para $Q = 100$ (líneas negra y roja). Sin embargo, sólo para $Q = 4$ la distorsión armónica de la señal (relacionado con el cociente entre la amplitud de los armónicos superiores y el fundamental A_n/A_1 [188]) es suficientemente alta como para ser detectada (véase figura 5.4b). Esto es debido a que para la misma fuerza de excitación F_0 , la amplitud libre $A_0 = F_0Q/k$ (véase ecuación 2.68) es menor cuanto menor es Q . Esto implica que el cociente A_n/A_0 crece a medida que Q disminuye. La adquisición de imágenes en armónicos superiores es más favorable en líquidos que en aire porque las condiciones en las que los armónicos generados son los mismos implican una utilización de $A_0 = 6 \text{ nm}$ en líquidos y de $A_0 = 160 \text{ nm}$ en aire. La utilización de amplitudes libres tan grandes en aire no es común.

La generación de armónicos para el caso de A_0 constante se presenta también en la figura 5.4 (líneas negra y verde). En este caso, la magnitud de los armónicos superiores para $Q = 4$ es mucho mayor que para $Q = 100$. Además, como A_0 es la misma en ambos casos ($A_0 \approx 6 \text{ nm}$), la distorsión armónica de la señal mayor para el caso de $Q = 4$.

Las simulaciones numéricas realizadas cuando la micropalanca opera en resonancia apuntan a una independencia de la generación de armónicos superiores en el factor de calidad cuando A_{sp} y F_0 son constantes. Sin embargo, en este caso la distorsión armónica A_n/A_1 sí depende de Q debido a la dependencia de A_1 en Q .

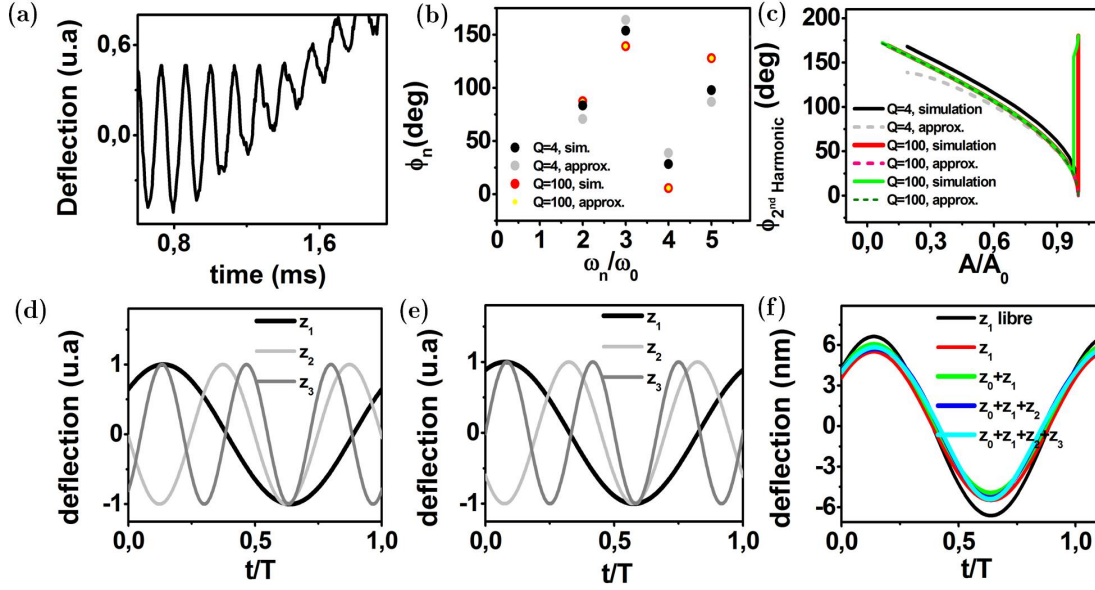


Figura 5.5: (a) Medida experimental de la oscilación de la micropalanca frente al tiempo a medida que la punta se aproxima a la muestra. La oscilación decrece de forma asimétrica. Comparación entre la aproximación dada por la ecuación 5.6 y la dada por las simulaciones numéricas (b) para ϕ_n frente a la frecuencia del armónico a una amplitud de trabajo $A_{sp} = 0.7A_0$ y (c) para ϕ_2 frente a A/A_0 . Comportamiento temporal dado por las simulaciones numéricas para z_1 , z_2 y z_3 para (d) $Q = 4$ y (e) $Q = 100$ y (f) comportamiento de la oscilación z_n frente a t/T dependiendo del número de armónicos considerados.

5.2.2. Decrecimiento asimétrico de la señal

En las simulaciones numéricas se observa un decrecimiento asimétrico de la oscilación en líquidos a medida que la distancia entre la punta y la muestra disminuye. Los mínimos de la señal parecen reducirse, mientras que los máximos se mantienen constantes. Esto está en acuerdo con lo observado experimentalmente por muchos autores [87, 109, 106, 195, 196] y por lo encontrado en los experimentos sobre la membrana púrpura en líquidos (véase figura 5.5a). En principio, existen muchos parámetros de los que depende la oscilación. Para simplificar el problema, aquí se plantea una aproximación para la fase de los armónicos superiores ϕ_n . Los resultados de las simulaciones numéricas realizadas para una micropalanca de $k = 4$ N/m y $f_0 = 103.784$ kHz y factores de calidad $Q = 4$ y $Q = 100$ oscilando con una fuerza de excitación constante de $F_0 = 6$ nN sugieren una dependencia de la fase de los armónicos superiores en la fase del armónico fundamental ϕ_1 . La fase de los armónicos superiores ϕ_n parece depender de n y de ϕ_1 de acuerdo a la ecuación:

$$\phi_n = n\phi_1 - (n - 1)\pi \quad (5.6)$$

En la figura 5.5b se compara la aproximación dada por la ecuación 5.6 con las fases obtenidas en las simulaciones numéricas para $A_{sp} = 0.7A_0$. Para $Q = 100$ la aproximación es buena, mientras que para $Q = 4$ diverge ligeramente. Esto también se puede observar en la figura 5.5c, en la que se muestra la misma comparación para todo el rango de amplitudes de trabajo, y en la figura 5.5d-e, donde se observa el comportamiento temporal del armónico fundamental, del segundo y del tercero hallados a través de las simulaciones. La fase de los armónicos parece depender también ligeramente del valor de Q . Suponiendo que la distancia mínima y la distancia máxima ocurren en el mínimo y en el máximo del armónico fundamental respectivamente:

$$z_{\min} = z_{1,\min} \quad (5.7)$$

se puede minimizar z_1 y obtener el tiempo en el que la distancia mínima ocurre:

$$t_{\min} = \frac{\phi_1 + (2n + 1)\pi}{\omega} \quad (5.8)$$

Teniendo también una aproximación para ϕ_n (dada por la ecuación 5.6), es entonces posible aproximar la amplitud total en el mínimo y en el máximo del armónico fundamental. Truncando el desarrollo de $z(t)$ (ecuación 5.5) en el tercer armónico éstas vienen dadas por:

$$z(t_{\min}) = z_c + z_0 - A_1 - A_2 - A_3 \quad (5.9)$$

$$z(t_{\max}) = z_c + z_0 - A_1 - A_2 + A_3 \quad (5.10)$$

La aproximación 5.6, aún a pesar de no incluir la ligera dependencia de ϕ_n en Q , describe fielmente la razón por la que la oscilación decrece asimétricamente en líquidos y que observamos experimentalmente. La combinación de una deflexión estática z_0 con la generación de los armónicos superiores resulta en un decrecimiento menor en la parte inferior de la señal que en la parte superior de la señal (véase ecuaciones 5.9 y 5.10) que produce un decrecimiento asimétrico de la señal total como la que se observa en la figura 5.5f.

5.2.3. Dependencia de t_c y F_{peak} en los parámetros de la oscilación

Cuando la fuerza de interacción actúa sólo durante una corta fracción del periodo de oscilación y se aproxima a una fuerza de impacto, se pueden considerar el tiempo de contacto como el tiempo en el que la fuerza actúa. Observando la figura 5.5f se puede observar que t_c depende principalmente de z_c , z_0 y A_1 . Otro parámetro característico de la interacción es la fuerza máxima de interacción, que ocurre cuando la distancia es mínima. La distancia mínima d_{\min} depende principalmente de z_c , A_1 ,

Generación de armónicos superiores en medios de factor de calidad bajo

z_0 , A_n y ϕ_n . Realizando la aproximación para ϕ_n dada por la ecuación 5.6, la fuerza máxima pasa a depender de z_c , A_1 , z_0 y A_n .

Sustituyendo la ecuación 5.8 en la ecuación 5.5 se puede obtener una expresión para hallar la distancia mínima, dependiendo del número de armónicos considerados:

$$d_{\min} = z_c + z_0 + A_1 \cos(\omega t - \phi_1) + \sum_{n=1}^{n_{\text{fin}}} A_n \cos(n\omega t - n\phi_1 + (n-1)\pi) \quad (5.11)$$

En la figura 5.6a se presenta la comparación entre la d_{\min} obtenida a través de simulaciones numéricas y la hallada a partir de la aproximación dada por la ecuación 5.11 para distintos valores de n_{fin} . La aproximación no se desvía de forma apreciable para $Q = 4$, mientras que para $Q = 100$ existe una discrepancia mayor debido a la abrupta variación de la fuerza de interacción con la distancia mínima en el modelo DMT.

Además, suponiendo que la fuerza entra cuando la distancia $d = d_0$ (usualmente del orden de la distancia atómica) en el tiempo $t_0 = t_{\min} - t_c/2$ se pueden obtener varias expresiones para hallar el tiempo de contacto t_c dependiendo de haber incluido o no al segundo armónico superior en el cálculo:

$$d_0 = z_c + z_0 - A_1 \cos\left(\frac{t_c^{(a)}\omega}{2}\right) \quad (5.12)$$

$$d_0 = z_c + z_0 - A_1 \cos\left(\frac{t_c^{(b)}\omega}{2}\right) - A_2 \cos(t_c\omega) \quad (5.13)$$

Despejando t_c se tiene:

$$t_c^{(a)} = \frac{2}{\omega} \arccos\left(\frac{z_0 + z_c - d_0}{A_1}\right) \quad (5.14)$$

$$t_c^{(b)} = \frac{2}{\omega} \arccos\left(\frac{-A_1 + \sqrt{A_1^2 + 8A_2(A_2 - d_0 + z_0 + z_c)}}{4A_2}\right) \quad (5.15)$$

En la figura 5.6b se presenta la comparación entre el tiempo de contacto t_c obtenido a través de simulaciones numéricas y el hallado a partir de las aproximaciones dadas por las ecuaciones 5.14 y 5.15. Mientras que la ecuación 5.14 no proporciona una buena aproximación, la inclusión del segundo armónico en la aproximación (véase ecuación 5.15) proporciona un buen ajuste tanto para el caso de $Q = 4$ como para el de $Q = 100$.

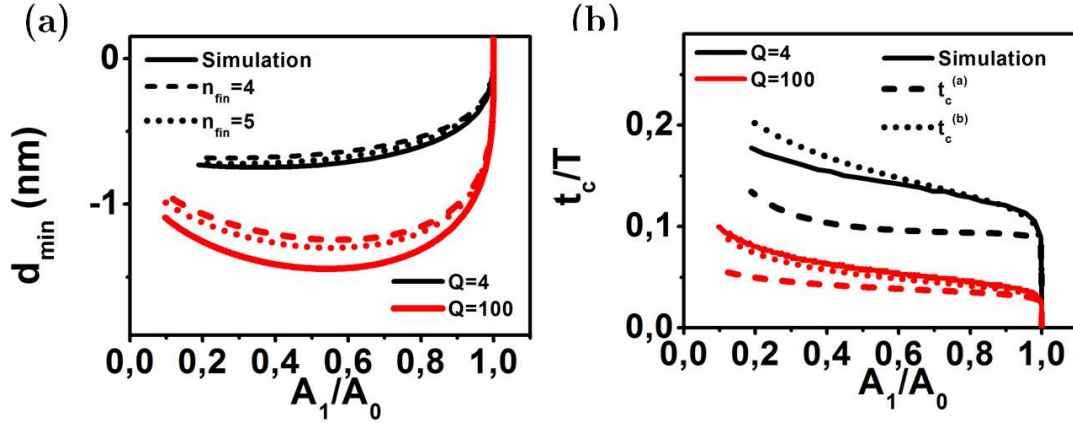


Figura 5.6: (a) distancia mínima d_{\min} y (b) tiempo de contacto t_c frente a A_1/A_0 para $Q = 4$ y $Q = 100$ teniendo en cuenta las aproximaciones de las expresiones dadas por las ecuaciones 5.11, 5.14 y 5.15.

5.2.4. Dependencia de la sensibilidad de los armónicos en el factor de calidad

A pesar de que para F_0 y A_1/A_0 constantes, y $\omega = \omega_0$ los armónicos generados son iguales para $Q = 4$ y $Q = 100$ (líneas negra y roja de la figura 5.6a), la sensibilidad de éstos a una variación en la constante de acoplo de la fuerza es mucho mayor en líquidos. En la figura 5.7 se presentan los armónicos generados para ambos casos sobre muestras con módulo de Young efectivo que varía desde 30 GPa hasta 300 MPa. Los valores están normalizados al valor de A_2 para agua y aire. En la figura se observa que la diferencia en la magnitud entre los armónicos es mayor cuanto menor es el módulo de Young efectivo de la muestra. Cuando $Q = 4$ esto se hace mucho más evidente (véase figura 5.7a). La razón por la que esto ocurre es que la sensibilidad está directamente relacionada con la atenuación de los armónicos y se verá en detalle en la sección 5.4.

5.2.5. Curva de resonancia

Hasta ahora se ha presentado lo que sucede en el caso particular en el que $\omega = \omega_0$. Es interesante observar lo que ocurre en el rango de frecuencias completo. En la figura 5.8 se presenta el comportamiento en frecuencia de A_1/A_0 , la del cociente entre la amplitud del segundo armónico y el fundamental A_2/A_1 y la de la fase ϕ_1 para $Q = 4$ y $Q = 100$ tanto en el caso de F_0 constante (líneas negra y roja) como en el de A_0 constante (líneas negra y verde) para diversos valores de la amplitud de trabajo $A_{sp}|_{\omega=\omega_0}$. En ella se observa cómo el comportamiento de A_2/A_1 depende principalmente de Q (las líneas negra y verde coinciden), mientras el comportamiento de ϕ parece ser independiente de Q .

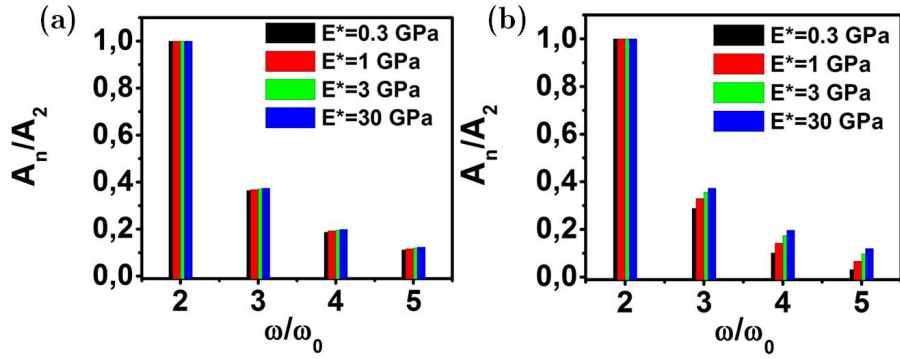


Figura 5.7: A_n/A_2 para (a) $Q = 4$ y (b) $Q = 100$ y diversos valores del módulo de Young efectivo E^* de la muestra para $A_{sp} = 0.8$.

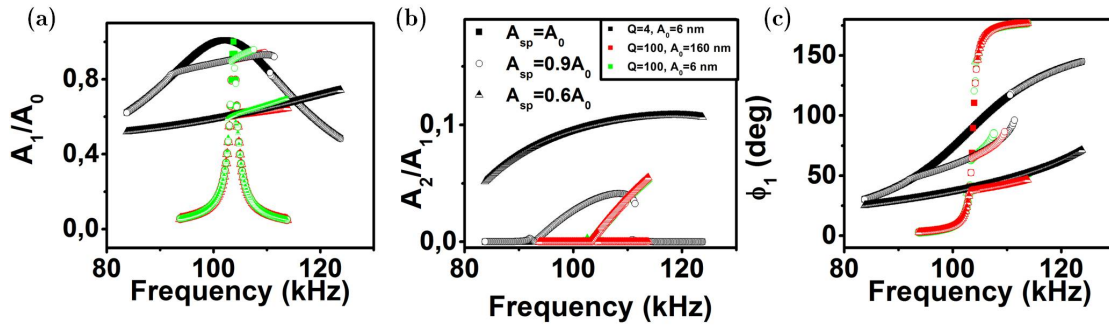


Figura 5.8: Curvas de resonancia utilizando simulaciones numéricas y modelando la fuerza de interacción como la del modelo DMT. (a) A_1/A_0 (b) A_2/A_1 , (c) ϕ_1 para diversos valores de A_1/A_0 para F_0 constante (líneas negra y roja) y para A_0 constante (líneas negra y verde).

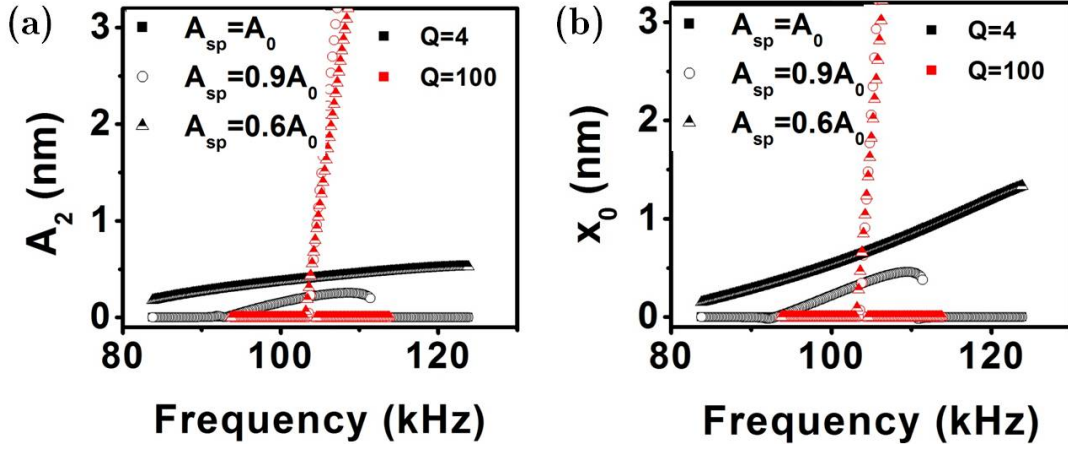


Figura 5.9: Curvas de resonancia utilizando simulaciones numéricas y modelando la fuerza de interacción como la del modelo DMT. (a) A_2 y (b) deflexión z_0 para diversos valores de la amplitud de trabajo A_{sp} para $F_0 = 6$ nN y $Q = 4$ (negro) y $Q = 100$ (rojo).

5.2.6. Deflexión y dependendencia de la sensibilidad de la deflexión en el factor de calidad

En las simulaciones numéricas se observa la aparición simultánea de un componente estático z_0 simultáneo con la generación de armónicos superiores cuyo comportamiento es similar al de éstos. En la figura 5.9 se observa el comportamiento en frecuencia de A_2 y z_0 frente a ω para el caso en el que F_0 es constante. Cuando $\omega = \omega_0$ ni la amplitud del segundo armónico ni la deflexión z_0 dependen del factor de calidad Q , tomando valores similares para diversas amplitudes de trabajo A_{sp} (véase símbolos negros y rojos de la figura 5.9). Esto es probablemente debido a que a esa frecuencia A_1/A_0 también es fija. Sin embargo, en el resto de valores de ω tanto z_0 como A_2 parecen depender de Q .

Al igual que en la sección anterior se presentó el contraste de A_n para diversos valores del módulo de Young efectivo, es ilustrativo hacer esto también en el caso de la deflexión. En la figura 5.10 se observa la dependencia de la deflexión con el módulo de Young para agua y aire frente a A_1/A_0 . A pesar de que el comportamiento de la deflexión z_0 con Q es similar al comportamiento de A_2 , su comportamiento con E^* es muy diferente. Mientras que para $Q = 4$ existe un pequeño contraste entre materiales a un A_1/A_0 fijo, para $Q = 100$ no existe contraste alguno. Esto también se tratará en más detalle en la sección 5.4.1.

5.2.7. Resumen

Las simulaciones numéricas han permitido, en primer lugar, escribir ecuaciones aproximadas que relacionan la fuerza máxima F_{peak} y el tiempo de contacto t_c

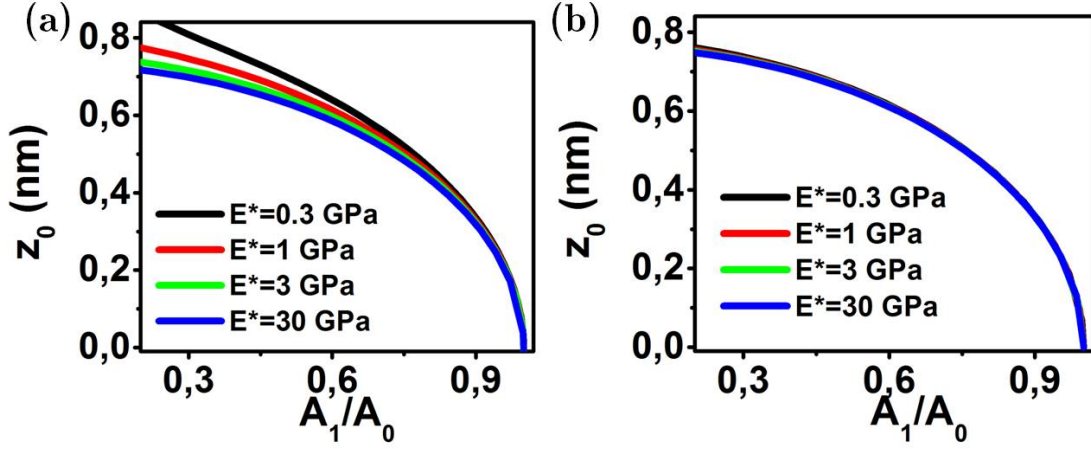


Figura 5.10: Comportamiento de z_0 frente a A_1/A_0 (a) $Q = 4$ (b) $Q = 100$ a $F_0 = 6$ nN para distintos valores del módulo de Young efectivo.

con los parámetros de la oscilación. Para modelar el comportamiento de F_{peak} de forma correcta en aire es necesario incluir las contribuciones a la oscilación total de la deflexión z_0 y hasta el quinto de los armónicos superiores. Para modelar el comportamiento de t_c correctamente es suficiente incluir la deflexión x_0 y el segundo armónico A_2 . Esto también permite reproducir el decrecimiento asimétrico de la señal en medios de factor de calidad bajo a través del análisis de la contribución de cada armónico a la oscilación total.

En segundo lugar, estudiar la dependencia de la generación de armónicos superiores en el factor de calidad Q . Cuando $\omega = \omega_0$ y A_1/A_0 es constante los armónicos generados no dependen de Q , mientras que para $\omega \neq \omega_0$ sí lo hacen. Sin embargo, a pesar de que es posible obtener armónicos similares en magnitud en aire y en agua (cuando $\omega = \omega_0$ y F_0 y A_1/A_0 son constantes) existen dos diferencias significativas. La primera es que el cociente de amplitudes A_2/A_0 sí depende de Q , de tal forma que la distorsión armónica A_n/A_1 también lo hace, facilitando la adquisición de imágenes en armónicos superiores en medios de factor de calidad bajo. La segunda, que los armónicos no se comportan de forma equivalente ante un cambio en el módulo de Young efectivo, siendo los armónicos en agua más sensibles que los armónicos en aire. Finalmente, se observa que el término estático deflexión se comporta en magnitud y sensibilidad como el segundo armónico en cuanto a su dependencia en Q .

5.3. Aproximación analítica

En esta sección trataré de aproximar el problema de la generación de armónicos superiores de forma analítica. Esto se puede hacer desde una aproximación newtoniana (resolviendo la ecuación del movimiento), o utilizando cantidades pro-

medio. En el siguiente apartado presentaré la aproximación basada en teoría de perturbaciones.

5.3.1. Teoría de perturbaciones

Existen muchos trabajos teórico desarrollados en torno al oscilador armónico forzado que incluyen fuerzas no lineales. El más extendido es el modelo de Duffing, que incluye el término de fuerza no lineal como αx^3 [197, 198, 199, 200, 201].

En esta sección se introducirá cómo resolverlo en base a teoría de perturbaciones. Esto consiste en suponer la interacción como una perturbación del movimiento ϵF_{ts} . Si además, también los términos de disipación y de excitación se consideran perturbaciones, la ecuación a estudiar es:

$$\ddot{z}(t) + \epsilon \frac{\omega_0}{Q} \dot{z}(t) + \omega_0^2 z(t) = \epsilon \frac{F_0}{m} \cos(\omega t) + \epsilon F_{ts} \quad (5.16)$$

La oscilación se puede desarrollar también en potencias de la perturbación, de tal forma que:

$$z = z_0 + \epsilon z + \epsilon^2 z^2 + O(3) \quad (5.17)$$

Combinando las ecuaciones 5.16 y 5.17 se obtienen diversas ecuaciones para los diversos órdenes en ϵ , de tal forma que se puede resolver cada una de ellas y hallar la solución del sistema global.

Para simplificar el problema se considerará una fuerza cuadrática de la forma [202]:

$$F_{ts} = \epsilon \alpha z^2 \quad (5.18)$$

para la que se puede hallar de forma analítica A_2 en función de la constante de acoplo de la fuerza cuadrática:

$$A_2 = \frac{\alpha A_1^2}{6\omega_0^2} \quad (5.19)$$

$$z_0 = -\frac{\alpha A_1^2}{2\omega_0^2} \quad (5.20)$$

Las ecuaciones 5.19 y 5.20 no reproducen la dependencia de los armónicos A_n y de la deflexión z_0 en la fuerza de excitación F_0 que las simulaciones que utilizaban el modelo DMT para la fuerza de interacción sugerían. En la sección anterior vimos cómo a F_0 constante, A_1/A_0 constante y $\omega = \omega_0$, la amplitud de los armónicos superiores no dependía de Q . Sin embargo, para una fuerza cuadrática, la ecuación 5.19 pronostica una dependencia de A_n en A_1 y consecuentemente en Q . En la figura 5.11b se puede observar cómo el cociente $A_2/\alpha A_1$ depende de Q (en $\omega = \omega_0$ las curvas negra y verde coinciden, y están muy alejadas de la curva roja). Esto también está

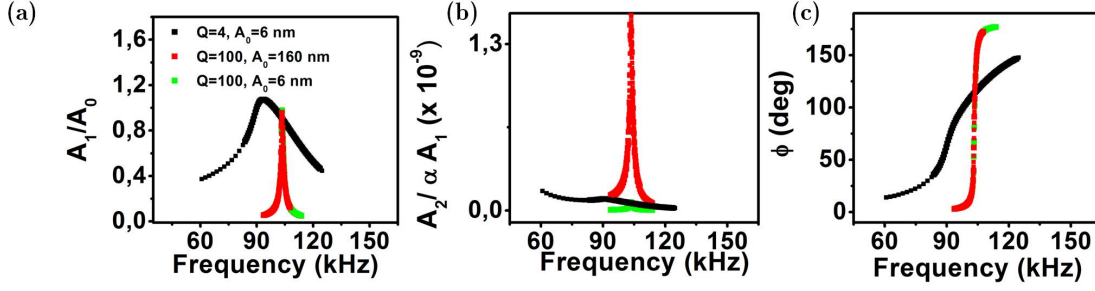


Figura 5.11: Curvas de resonancia utilizando simulaciones numéricas y modelando la fuerza de interacción como una fuerza cuadrática. (a) A_1/A_0 , (b) $A_2/\alpha A_1$ y (c) ϕ frente a ω para amplitud libre A_0 constante (líneas negra y verde) y a fuerza de excitación constante (líneas negra y roja) para $Q = 4$ y $Q = 100$.

de acuerdo con la expresión 5.19, que pronostica que esta magnitud es proporcional a A .

La figura 5.11 constata que el modelo de fuerza cuadrática, además de no reproducir el comportamiento de A_2/A_1 , tampoco reproduce la forma de las curvas de resonancia del modelo DMT (véase figura 5.8). Esto es coherente con el hecho de que si intentamos desarrollar la fuerza que aparece en el modelo DMT por un polinomio en torno a la distancia mínima, no es posible que un desarrollo de potencias de únicamente dos términos sea una buena aproximación de la fuerza real. Hasta mi conocimiento, una desarrollo en series de Taylor de la fuerza del modelo DMT en torno a la distancia mínima habría de incluir más de 25 términos, no haciendo posible un desarrollo analítico.

Sin embargo, a continuación se presenta otro enfoque al problema. Si se modifica la fuerza de interacción y se utiliza para reproducir el comportamiento de los armónicos superiores observado en las simulaciones la dada por:

$$F_{ts}(d) = \begin{cases} \alpha(d - d_0)^2 & x \leq d_0 \\ 0 & x > d_0 \end{cases} \quad (5.21)$$

En la figura 5.12 se observa cómo al considerar una fuerza cuadrática definida a trozos con $d_0 = 1 \text{ nm}$ se reproduce el comportamiento de las curvas de resonancia del modelo DMT: A_2/A_1 depende principalmente de Q , mientras que ϕ no lo hace. Varios autores ya apuntaron la importancia que tiene en la dinámica de la micropalanca el hecho de que las fuerzas entren únicamente en una parte del ciclo [203, 204, 205, 206]. La no linealidad que introduce el cambio en la constante elástica de la fuerza en el momento del impacto es a veces más importante que el tipo de no linealidad de la fuerza en sí (cuadrática, cúbica, racional...) [203]. Tanto las aproximaciones basadas en una fuerza lineal a trozos [204], como las basadas en una fuerza no lineal de impacto [205, 206] proporcionan un comportamiento similar

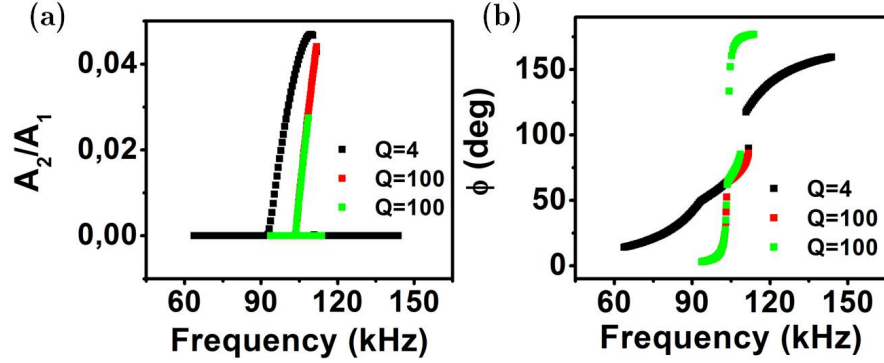


Figura 5.12: Curvas de resonancia para una fuerza cuadrática que entra en $d = 1$ nm. (a) A_2/A_0 y (b) ϕ frente a ω para amplitud libre A_0 constante (líneas negra y verde) y a fuerza de excitación constante (líneas negra y roja) para $Q = 4$ y $Q = 100$.

para la curva de resonancia de A_1 . Sin embargo, para reproducir la generación de armónicos superiores es necesario introducir una fuerza no lineal [186].

En la figura 5.13 se muestra la importancia de que la fuerza no entre en todo el ciclo, sino en una parte de él. Las simulaciones fueron realizadas disminuyendo progresivamente el tiempo del ciclo en el que entraba la fuerza. A medida que la fuerza entra durante menos parte del ciclo, la curva de resonancia se aproxima mejor a la dada por las simulaciones utilizando la fuerza del modelo DMT con una constante de acoplo negativa (triángulos negros en la figura 5.13a).

El problema de esta aproximación es que es preciso resolver el problema en las dos zonas con distinta fuerza de interacción, unir ambas soluciones y hallar las constantes deseadas a partir del conocimiento del tiempo en el que ocurre el contacto t_a y la distancia en la que entra la fuerza d_0 . Esto puede hacerse de forma numérica, pero así tampoco es posible dar una dependencia analítica de A_n en la fuerza de interacción.

5.3.2. Método basado en cantidades promedio

La otra forma de enforzar el problema de forma analítica es a través de las ecuaciones del virial y de la energía disipada. Si suponemos que la deflexión ya no es una señal armónica, sino que la señal está distorsionada por la generación de armónicos superiores A_n a las frecuencias de oscilación $n\omega$ se tiene que:

$$z(t) = z_0 + \sum_{n \geq 1} A_n \cos(n\omega t - \phi_n) \quad (5.22)$$

Combinando esta ecuación 3.9 con las ecuaciones 4.8 y 4.9 (con $n = 1$) se obtiene [177]:

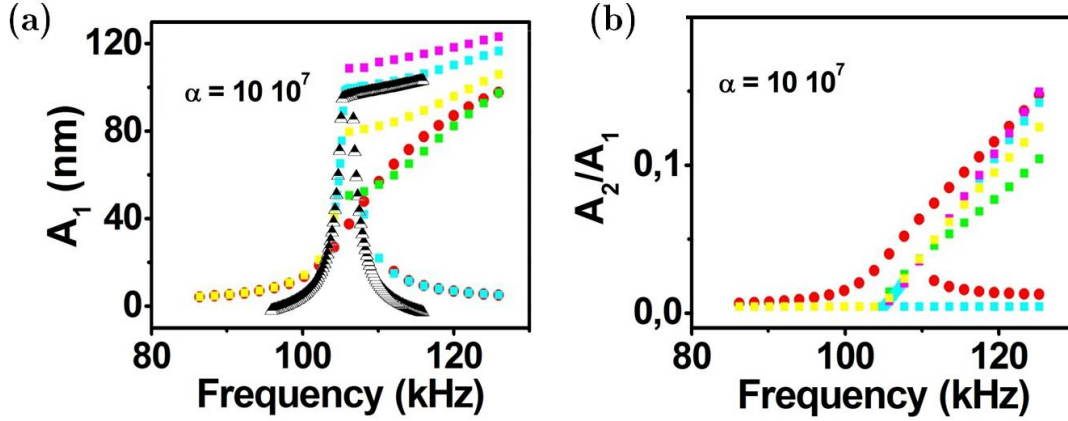


Figura 5.13: (a) A_1 y (b) A_2/A_1 frente a ω/ω_0 para una fuerza cuadrática definida a trozos a medida que la fuerza entra, primero en todo el ciclo (rojo) y luego progresivamente en menos parte del ciclo (verde, amarillo, azul y rosa). Los triángulos negros en (a) corresponden a la curva de resonancia para la fuerza del modelo DMT.

$$\sin \phi_1 = \frac{\omega}{\omega_0 A_0 A_1} \sum_{n \geq 1} n^2 A_n^2 + \frac{Q E_{ts}}{\pi k A_0 A_1} \quad (5.23)$$

Truncando el desarrollo de $z(t)$ en $n = 2$, se tiene:

$$E_{ts} = \frac{\pi k A_0 A_1}{Q} \sin \phi_1 - \frac{\pi \omega k}{\omega_0 Q} (A_1^2 + 4A_2^2) \quad (5.24)$$

Cuando la energía disipada entre la punta y la muestra es despreciable ($E_{ts} \approx 0$) (ecuación 5.25), la fase depende únicamente del valor del setpoint A_{sp} y del cociente $\frac{A_2}{A_1}$. Para dar una relación adicional que relacionase la fuerza de interacción y A_2 se necesitaría recurrir también a la ecuación del virial (ecuación 4.7). Hasta mi conocimiento, no es posible resolver las integrales que aparecen modelando la fuerza de interacción como la del modelo DMT y así hallar una ecuación adicional.

$$\sin \phi_1 = \frac{\omega A_1}{\omega_0 A_0} \left(1 + 4 \frac{A_2^2}{A_1^2} \right) \quad (5.25)$$

5.4. Aproximación semi-analítica

En la sección anterior hemos visto la imposibilidad de encontrar expresiones analíticas para A_n . Por esa razón en esta sección presentaré una aproximación semi-analítica que es útil en muchos casos. En el año 2000, Dürig obtuvo una relación entre los armónicos superiores y la fuerza de excitación utilizando FM-AFM y despreciando el término relacionado con la disipación en el medio [133]. Siguiendo el

mismo procedimiento, se puede encontrar una relación entre los armónicos superiores y la fuerza de excitación para AM-AFM incluyendo la disipación en el medio para así incluir la dependencia en Q . Para ello se pueden multiplicar las ecuaciones del movimiento correspondiente a AM-AFM bajo excitación magnética (ecuación 2.63) por el coseno y el seno de cada armónico ($\cos(n\omega t - \phi_n)$ y $\sin(n\omega t - \phi_n)$) respectivamente:

$$\frac{\pi}{\omega}(\omega_0^2 A_n - n^2 \omega^2 A_n) = \frac{\omega_0^2}{k} \int_0^T F_{ts}(t) \cos(n\omega t - \phi_n) dt \quad (5.26)$$

$$\frac{\pi}{\omega} \frac{\omega_0}{Q} n \omega A_n = \frac{\omega_0^2}{k} \int_0^T F_{ts}(t) \sin(n\omega t - \phi_n) dt \quad (5.27)$$

Descomponiendo $\cos(n\omega t - \phi_n)$ y $\sin(n\omega t - \phi_n)$ queda:

$$\frac{\pi}{\omega} (\omega_0^2 A_n - n^2 \omega^2 A_n) = \frac{\omega_0^2}{k} \left(\int_0^T F_{ts}(t) \cos(n\omega t) \cos(\phi_n) + \int_0^T F_{ts}(t) \sin(n\omega t) \sin(\phi_n) dt \right) dt \quad (5.28)$$

$$\frac{\pi}{\omega} \frac{\omega_0}{Q} n \omega A_n = \frac{\omega_0^2}{k} \left(\int_0^T F_{ts}(t) \sin(n\omega t) \cos(\phi_n) dt - \int_0^T F_{ts}(t) \cos(n\omega t) \sin(\phi_n) dt \right) \quad (5.29)$$

De este sistema de ecuaciones con dos incógnitas A_n y ϕ_n se obtiene una expresión para la amplitud A_n , que viene dada por:

$$A_n = \beta_n(\omega_0, \omega, k, Q) \gamma_n(T) \quad (5.30)$$

donde:

$$\beta_n(\omega_0, \omega, k, Q) = - \frac{\omega_0}{\pi k \sqrt{\frac{n^2}{Q^2} + \frac{\omega_0^2}{\omega^2} \left(1 - \frac{n^2 \omega^2}{\omega_0^2}\right)^2}} \quad (5.31)$$

$$\gamma_n(T) = \sqrt{\left(\int_0^T F_{ts}(t) \cos n\omega t dt\right)^2 + \left(\int_0^T F_{ts}(t) \sin n\omega t dt\right)^2} \quad (5.32)$$

y la fase ϕ_n de cada armónico, que toma la forma:

$$\phi_n = \arccos \left(\frac{\frac{\omega}{\pi \left(1 - \frac{n^2 \omega^2}{\omega_0^2}\right)} \left(\int_0^T F_{ts}(t) \cos n\omega t dt\right) + \frac{\omega_0 Q}{n} \left(\int_0^T F_{ts}(t) \sin n\omega t dt\right)}{\sqrt{\left(\frac{\omega^2}{\pi \left(1 - \frac{n^2 \omega^2}{\omega_0^2}\right)} + \frac{\omega_0^2 Q}{n^2}\right)} \sqrt{\left(\int_0^T F_{ts}(t) \cos n\omega t dt\right)^2 + \left(\int_0^T F_{ts}(t) \sin n\omega t dt\right)^2}} \right) \quad (5.33)$$

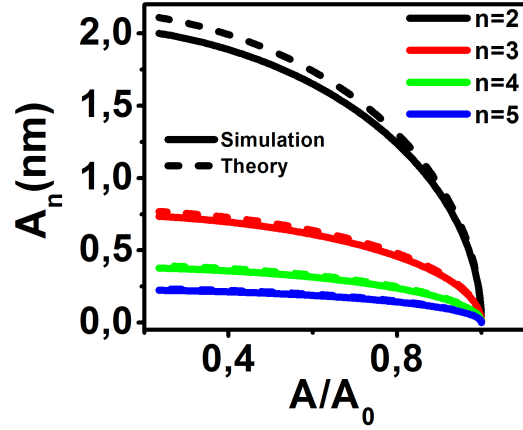


Figura 5.14: Comparación entre los valores obtenidos para A_2 frente a A_1/A_0 utilizando las simulaciones numéricas y utilizando la aproximación semi-analítica dada por la ecuación 5.30 para el caso $Q = 4$ y $F_0 = 6$ nN. Los valores de $\gamma_n(T)$ fueron obtenidos a través de las simulaciones.

Las ecuaciones 5.30, 5.31 y 5.32 proporcionan la dependencia de A_n con los parámetros de la micropalanca k , Q , ω_0 y ω , así como con la dependencia temporal de la fuerza de interacción. En la figura 5.14 se observa la comparación entre esto y lo obtenido a través de simulaciones numéricas. Las integrales que aparecen en la ecuación 5.32 han sido obtenidas a través de simulaciones numéricas. La correspondencia entre ambas curvas es buena para todo el rango de valores de A/A_0 .

Dependencia con k

Las ecuaciones 5.30 y 5.31 indican que la amplitud de los armónicos superiores es inversamente proporcional a la constante de fuerzas k de la micropalanca. En aire, donde siempre existe una fina capa de agua sobre la muestra que resulta en la aparición de fuerzas capilares, es necesario el uso de micropalancas con mayor constante de fuerzas para así aumentar la fuerza de recuperación de la micropalanca y que ésta no se quede pegada a la muestra. Sin embargo, la ausencia de estas fuerzas capilares en líquidos facilita el uso de micropalancas blandas para incrementar así la sensibilidad. Por esta razón, la generación de armónicos superiores aumenta de forma natural en líquidos. En este capítulo no se considerará este hecho, sino que se estudiará la diferencia entre una micropalanca de igual k vibrando en aire y en líquidos.

Dependencia con ω_0

La utilización de micropalancas blandas en líquidos también resulta en una disminución en ω_0 (véase ecuación 2.24 de la página 31), aunque, como fue mencio-

nado anteriormente en este capítulo, este hecho no será considerado. Sin embargo, ω_0 cambia en líquidos con respecto a aire por una causa adicional. También de acuerdo a la ecuación 2.24 de la página 31, el incremento de masa efectiva que tiene lugar en líquidos resulta en una disminución en la frecuencia de resonancia ω_0 . Esto en principio parece afectar a la amplitud de los armónicos superiores. Sin embargo, si se analiza la expresión 5.32 se observa que los límites de integración que aparecen también cambian. Suponiendo que el aumento de masa añadida en líquidos resulta en $\omega_{0,\text{air}} = \alpha\omega_{0,\text{liq}}$. Cuando $\omega = \omega_0$ se puede comparar la amplitud de los armónicos superiores A_n en líquidos y en aire:

$$A_n|_{\text{liq}} = -\frac{\omega_{0,\text{liq}}}{\pi k \sqrt{\frac{n^2}{Q_{\text{liq}}^2} + (1-n^2)^2}} \gamma_n(T_{\text{liq}}) = -\frac{\omega_{0,\text{liq}}}{\pi k \sqrt{\frac{n^2}{Q_{\text{liq}}^2} + (1-n^2)^2}} T_{\text{liq}} \gamma'_n \quad (5.34)$$

$$A_n|_{\text{air}} = -\frac{\omega_{0,\text{air}}}{\pi k \sqrt{\frac{n^2}{Q_{\text{air}}^2} + (1-n^2)^2}} \gamma_n(T_{\text{air}}) = -\frac{\omega_{0,\text{air}}}{\pi k \sqrt{\frac{n^2}{Q_{\text{air}}^2} + (1-n^2)^2}} T_{\text{air}} \gamma'_n \quad (5.35)$$

$$= -\frac{\alpha\omega_{0,\text{liq}}}{\pi k \sqrt{\frac{n^2}{Q_{\text{air}}^2} + (1-n^2)^2}} \frac{T_{\text{liq}}}{\alpha} \gamma'_n \quad (5.36)$$

donde

$$\gamma'_n = \sqrt{\left(\int_0^1 F_{ts}(t) \cos 2\pi n t' dt'\right)^2 + \left(\int_0^1 F_{ts}(t) \sin 2\pi n t' dt'\right)^2} \quad (5.37)$$

no depende de T . La dependencia de $\beta_n(\omega_0, \omega_0, k, Q)$ en Q es muy pequeña, con lo que la amplitud de los armónicos no dependería de considerar o no la masa efectiva m^* del medio. A lo largo de las simulaciones realizadas en este capítulo he considerado que m^* y por tanto ω_0 es la misma en ambos medios.

Dependencia con Q

Si bien la ecuación 5.30 reproduce el comportamiento de A_n con la frecuencia, no lo hace completamente con el factor de calidad. Existe un término en el denominador de β_n que es proporcional a n^2/Q^2 , pero este sumando es despreciable frente al sumando $(1-n^2)^2$, especialmente en el caso en el que $Q = 100$. La alta dependencia de A_n en Q está intrínsecamente incluida en la integral que contiene a $F_{ts}(t)$ dada por γ_n (véase ecuación 5.32). Por una parte, $F_{ts}(t)$ depende de la ley de fuerzas $F_{ts}(d)$, que se puede recuperar a partir del conocimiento de la fuerza máxima en la distancia mínima entre la punta y la muestra $F_{\text{peak}}(d_{\text{min}})$. Por otra parte, depende del comportamiento de la distancia mínima con el tiempo $d_{\text{min}}(t)$. El factor de calidad Q cambia bruscamente la oscilación de la micropalanca y las magnitudes z_0 , A_1 , ϕ_1 y A_n , lo que resulta en una gran dependencia de $d_{\text{min}}(t)$ en

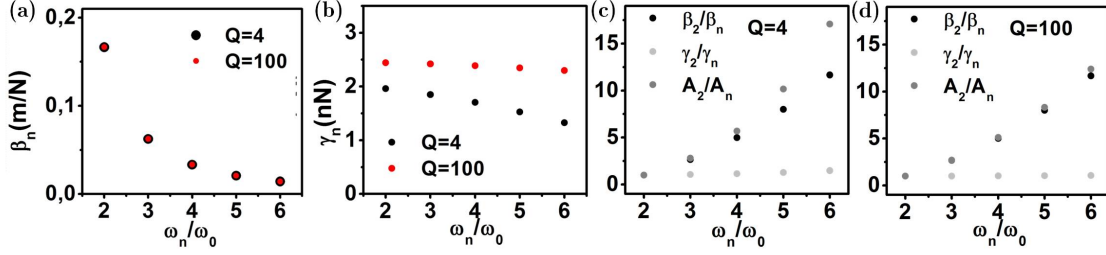


Figura 5.15: (a) β_n , (b) γ_n y cocientes respectivos comparados con el de la amplitud del segundo armónico A_2 para (c) $Q = 4$ y (d) $Q = 100$ a F_0 constante y $A_{sp} = 0.7A_0$.

Q . Por esta razón, incluso si se supone la misma ley de fuerzas $F_{ts}(d)$ para medios con distinto Q , hipótesis que no es cierta debido a que las constante de acoplo de la fuerza cambian [19], el comportamiento temporal de la fuerza $F_{ts}(t)$ dependerá del factor de calidad Q .

5.4.1. Atenuación de los armónicos

La ecuación 5.30 reproduce correctamente el comportamiento de la amplitud de los armónicos con ω , esto es, con el orden del armónico n ($\omega = n\omega_1$).

Como se observa en la figura 5.14, la amplitud de los armónicos A_n decrece a medida que n crece. Esto implica que el cociente entre A_2 y los armónicos superiores aumenta a medida que n crece. Este atenuamiento de los armónicos tiene una contribución del término β_n y otra del término γ_n . En la figura 5.15 se presenta una comparación entre las contribuciones de cada término para $Q = 4$ y para $Q = 100$ cuando $A_{sp} = 0.8A_0$. En las figuras 5.15a-b se observa cómo la disminución del término β_n es independiente de Q , mientras que el término γ_n es aproximadamente constante para $Q = 100$ y se atenúa ligeramente para $Q = 4$. Sin embargo, la atenuación de los armónicos A_n es grande en ambos medios. En las figuras 5.15c-d se observa que para $Q = 100$ la atenuación de A_n es debida a la atenuación de β_n , mientras que para $Q = 4$, la atenuación de A_n tiene una pequeña componente adicional debido a la atenuación de γ_n . De cualquier forma, β_n es el responsable principal de la atenuación de A_n en ambos medios. Existen trabajos que relacionan la atenuación del armónico con el momento en el que su periodo T/n es comparable al tiempo de contacto t_c [191]. En las simulaciones numéricas el tiempo de contacto es mayor en líquidos que en aire. Por esta razón, el periodo T/n del armónico será antes comparable a t_c en líquidos que en aire, lo que se manifiesta en una atenuación más rápida en líquidos que en aire. Esto está relacionado con la variación de los armónicos a variaciones en el módulo de Young efectivo de una muestra visto en la sección 5.2.4; debido a que el tiempo de contacto en líquidos varía más con el módulo de Young, los armónicos se atenuarán también más, incrementando así el contraste entre éstos.

5.5. Método para reconstruir el módulo de Young efectivo E^* a partir de A_{sp} , z_0 , A_2 y A_3

La aproximación semi-analítica al problema vista en la sección 5.4 acude a las simulaciones numéricas para obtener los valores de γ_n . Si se pudiera dar una relación entre el tiempo de contacto, la fuerza máxima y γ_n , podría, relacionarse mediante una fórmula analítica las amplitudes A_n y los parámetros del contacto para así relacionar luego A_n con la constante de acoplo de la fuerza de interacción. A lo largo de esta sección se utilizará una micropalanca de $k = 4$ N/m y $f_0 = 103.784$ kHz. A lo largo de esta sección se utilizará como fuerza de interacción la fuerza del modelo DMT (ecuación 4.3) con $H = 0$ J, y se denominará fuerza real, para compararla con los valores obtenidos a partir del método de reconstrucción propuesto.

5.5.1. Validez de la aproximación como una fuerza de impacto repulsiva.

En esta sección presentaré la validez de la aproximación de considerar el término γ_n de la ecuación 5.30 tal que:

$$\gamma_n \propto F_{\text{peak}} t_c \quad (5.38)$$

En la figura 5.16 se observan los cocientes entre diversas magnitudes para $Q = 4$ y $Q = 100$ para los casos de F_0 constante (figura 5.16a) y A_0 constante (figura 5.16b). En ella se observa que para el caso de F_0 constante, los cocientes entre las amplitudes del segundo armónico A_2 son iguales a los cocientes entre las integrales que aparecen en γ_n y también iguales a los cocientes entre $F_{\text{peak}} t_c$. La aproximación de la fuerza como una fuerza de impacto repulsiva es correcta.

Sin embargo, en el caso de A_0 constante, el cociente entre las amplitudes del segundo armónico A_2 para distintos valores de Q son iguales a los cocientes entre las integrales que aparecen en γ_n , pero difieren de los correspondientes a $F_{\text{peak}} t_c$. Esto es debido a que la contribución de la parte atractiva en el caso de A_0 constante ($Q = 100$, $A_0 = 6$ nm) es comparable a la contribución de la parte repulsiva de la fuerza, lo que no sucedía para el caso de F_0 constante ($Q = 100$, $A_0 = 160$ nm), de tal forma que la aproximación de la fuerza como una fuerza de impacto repulsiva deja de ser válida.

5.5.2. Aproximación fenomenológica alternativa a $F_{ts}(t)$

No es posible determinar la integral que aparece en la expresión 5.32 sin conocer ϕ , puesto que el desfase entre la fuerza de interacción $F_{ts}(d)$ y el armónico $\cos(n\omega t)$ es esencial para el cálculo de γ . Sabemos que la fuerza de interacción es máxima cuando la distancia punta-muestra es mínima. Por esta razón, si suponemos una dependencia temporal para $F_{ts}(t)$ y ajustamos el armónico fundamental para que

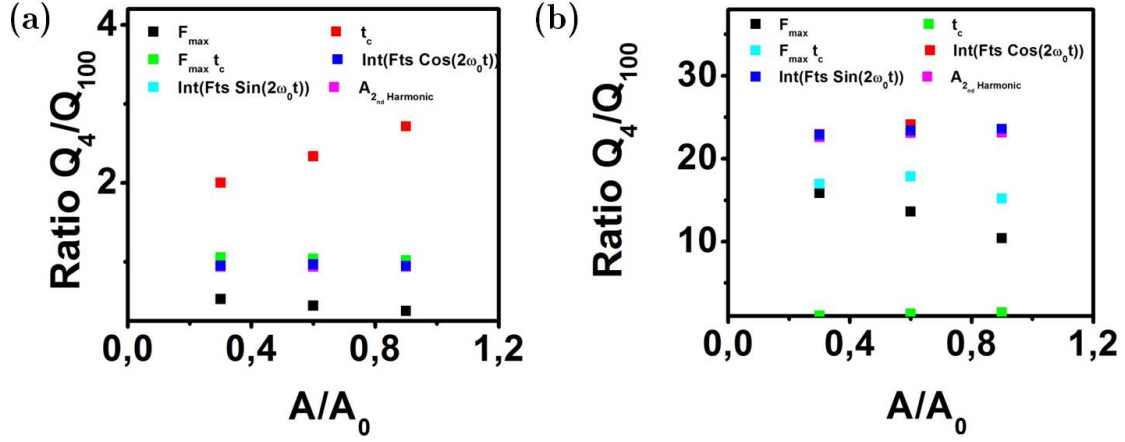


Figura 5.16: Cocientes entre F_{peak} , t_c , $F_{\text{peak}}t_c$, A_2 , $\int F_{ts} \cos \omega_0 t dt$ y $\int F_{ts} \sin \omega_0 t dt$ a $Q = 4$ y $Q = 100$ para (a) fuerza de excitación constante $F_0 = 6$ nN y (b) amplitud libre constante $A_0 = 6$ nm.

tenga su distancia mínima en momento en que la fuerza es máxima ($\phi = \omega_0 t_c + \pi$), es posible calcular las integrales que aparecen en la expresión 5.32. Stark y colaboradores [116] aproximaron de forma fenomenológica la función $F_{ts}(t)$ que aparece en $h(t)$ por una función a trozos que modelaría el contacto. Si se introduce la aproximación fenomenológica de Stark para $F_{ts}(t)$ [116] en las ecuaciones 5.30 y 5.32, ésta no parece ser adecuada para hallar correctamente las amplitudes de los armónicos superiores A_n . Por esta razón se ha buscado una aproximación que reproduzca mejor estas amplitudes. En cualquier caso, es necesario incluir una suma de funciones paso que haga que la fuerza sea cero en todo el ciclo a excepción del tiempo en el que ocurre el contacto:

$$F_{ts}(t) = g(t) \left[\Theta \left(t - \frac{t_c}{2} \right) - \Theta \left(t - \frac{3t_c}{2} \right) \right] \quad (5.39)$$

La ecuación 5.40 corresponde a la aproximación fenomenológica de Stark y colaboradores [116] a $g(t)$ en la ecuación 5.39. En la figura 5.17a se presenta el comportamiento temporal de esta aproximación $g_1(t)$ para la fuerza y de otras aproximaciones similares $g_2(t)$, $g_3(t)$ y $g_4(t)$ dadas por:

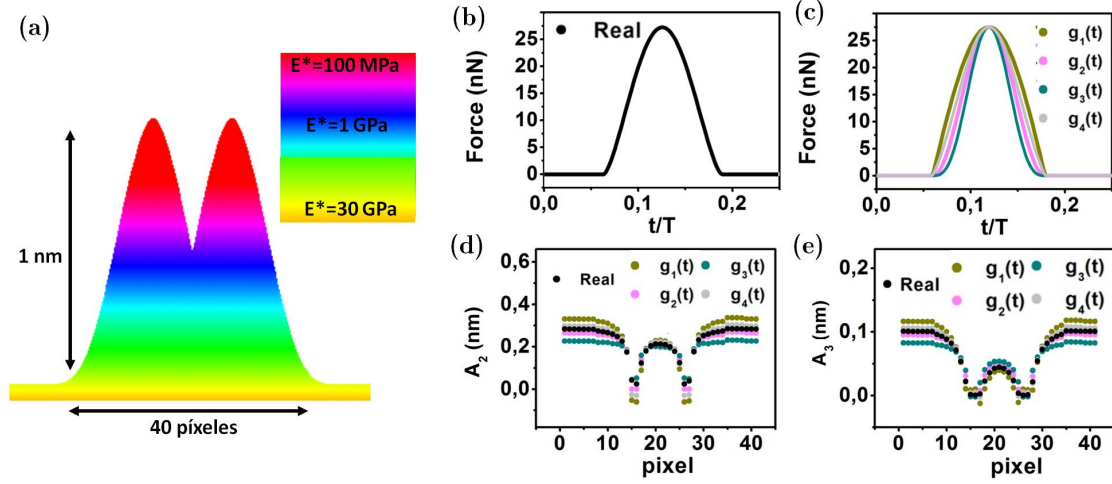


Figura 5.17: (a) Esquema de una muestra en la que la altura y el módulo de Young efectivo cambian. (b) Dependencia temporal de la fuerza dada por las simulaciones para $z_c = 5$ nm y $E^* = 32$ GPa. (c) Dependencia temporal de la fuerza hallada a partir de las aproximaciones 5.40-5.43. Comportamiento (d) A_2 y (e) A_3 obtenido a partir de las respectivas sustituciones en 5.30 al escanear la muestra que se presenta en (a).

$$g_1(t) = -F_{\text{peak}} \cos\left(\frac{\pi t}{t_c}\right) \quad (5.40)$$

$$g_2(t) = F_{\text{peak}} \cos\left(\frac{\pi t}{t_c}\right)^2 \quad (5.41)$$

$$g_3(t) = F_{\text{peak}} \cos\left(\frac{\pi t}{t_c}\right)^3 \quad (5.42)$$

$$g_4(t) = \frac{F_{\text{peak}}}{2} \left[\cos\left(\frac{\pi t}{t_c}\right)^2 - \cos\left(\frac{\pi t}{t_c}\right) \right] \quad (5.43)$$

Combinando las expresiones 5.40-5.43 con las ecuaciones 5.32 y 5.39 se obtienen distintas expresiones para $\gamma(t)$:

$$\gamma_1(n, T, F_{\text{peak}}, t_c) = \frac{2 \left(F_{\text{peak}} t_c T^2 \cos \left(\frac{\pi n t_c}{T} \right) \right)}{\pi (-4n^2 t_c^2 + T^2)} \quad (5.44)$$

$$\gamma_2(n, T, F_{\text{peak}}, t_c) = -\frac{\left(F_{\text{peak}} t_c T^3 \sin \left(\frac{\pi n t_c}{T} \right) \right)}{(2n^3 \pi t_c^2 - 2n\pi T^2)} \quad (5.45)$$

$$\gamma_3(n, T, F_{\text{peak}}, t_c) = 12 \frac{F_{\text{peak}} t_c T^4 \cos \left(\frac{\pi n t_c}{T} \right)}{(16n^4 \pi t_c^4 - 40n^2 \pi t_c^2 T^2 + 9\pi T^4)} \quad (5.46)$$

$$\gamma_4(n, T, F_{\text{peak}}, t_c) = \frac{F_{\text{peak}} t_c T^2}{4\pi} \left(\frac{T \sin \left(\frac{\pi n t_c}{T} \right)}{n^3 t_c^2 - nT^2} - \frac{4t_c \cos \left(\frac{\pi n t_c}{T} \right)}{T^2 - 4n^2 t_c^2} \right) \quad (5.47)$$

Combinando ahora la ecuación 5.30 y las ecuaciones 5.44-5.47 se obtienen diversas fórmulas analíticas para A_n en función de la fuerza máxima F_{peak} y t_c . Se ha simulado la interacción en varios píxeles, cada uno de ellos caracterizados por un E^* y una altura que simularía la composición y altura de la muestra a analizar. En la figura 5.17b-c se puede observar la comparación entre los valores estimados para A_2 y A_3 para cada una de las aproximaciones $g(t)$ con los hallados a partir de las simulaciones numéricas. Se puede apreciar que la utilización de las funciones $g_2(t)$ y $g_4(t)$ y especialmente ésta última para el cálculo de A_2 y A_3 , resulta en un ajuste muy bueno con respecto a los valores de A_2 y A_3 simulados.

5.5.3. Reconstrucción de t_c y F_{peak}

La posibilidad de relacionar de forma analítica A_n con F_{peak} y t_c permite proponer un método para calcular el módulo de Young reducido E^* de una muestra simultáneamente a la toma de imágenes de la misma. Para ello primero se utilizarán dos armónicos, el segundo y el tercero para hallar F_{peak} y t_c , y luego se utilizará la deflexión y armónicos superiores para estimar E^* .

En esta sección presentaré cómo utilizando la función $g_4(t)$ que relaciona $F_{ts}(t)$, F_{peak} y t_c se puede estimar F_{peak} y t_c . Para ello sólo son necesarias la toma de imágenes experimentales en dos canales adicionales. Se ha elegido A_2 y A_3 por ser los de mayor magnitud y estar así menos afectados por el ruido electrónico. En líquidos, esto es posible para la mayoría de casos, ya que las micropalancas utilizadas tienen una constante de fuerzas baja ($k \approx 0.1 - 0.9$ N/m). Para probar esto, al igual que antes se ha simulado la interacción en varios píxeles, cada uno de ellos caracterizados por un E^* y una altura que simularía la composición y altura de la muestra a analizar. Se ha resuelto la ecuación del movimiento de forma numérica en cada píxel de forma iterativa (variando z_c) hasta que el valor de A_1 es igual al valor de la amplitud de trabajo utilizado en la simulación (en este caso $A_{sp} = 0.9A_0$), obteniendo unos valores de salida para z_0 , A_n , ϕ_n , t_c y F_{peak} . En la figura 5.18a-b se muestran los correspondientes valores de salida para A_2 y A_3 .

En cada píxel se ha de resolver de forma numérica el sistema de ecuaciones:

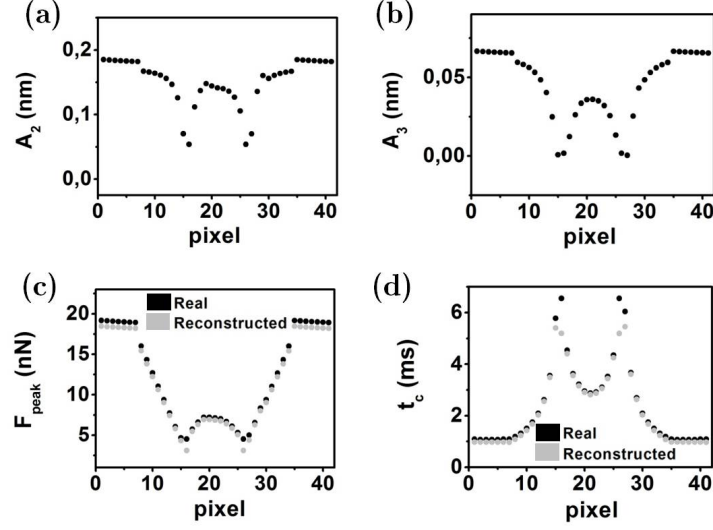


Figura 5.18: Valores simulados de (a) A_2 y (b) A_3 y comparación entre los valores simulados y los obtenidos a partir del método propuesto para la reconstrucción de (c) F_{peak} y (d) t_c a una amplitud de trabajo $A_{sp} = 0.9A_0$ al escanear la muestra que se presenta en la figura 5.17a.

$$A_2 = \beta_2 \gamma_4(2, T, F_{\text{peak}}, t_c) \quad (5.48)$$

$$A_3 = \beta_3 \gamma_4(3, T, F_{\text{peak}}, t_c) \quad (5.49)$$

En la figura 5.18c-d se muestran las correspondientes F_{peak} y t_c que son solución del sistema 5.48-5.48 junto a las de salida de la simulación. Ambos ajustes son buenos. El error en el cálculo de la fuerza máxima es de un 4% en agua y entre un 2.9 y un 3.4% en aire. El error en el cálculo de t_c en agua es de un 9.6% en materiales duros y desciende a un 2% en materiales blandos. En aire, siempre es menor que un 3%.

5.5.4. Reconstrucción de z_c y E^*

Una vez se tiene valores de F_{peak} y t_c es posible estimar los valores del módulo de Young efectivo E^* y de la distancia media punta-muestra z_c . Para ello es necesario suponer un modelo para la fuerza de interacción. En este caso utilizaré de nuevo el modelo DMT que ya apareció en el capítulo 4. Además, se han utilizado las aproximaciones vistas en la sección 5.2.3 para t_c y d_{min} . De esta forma queda de nuevo un sistema de ecuaciones con dos incógnitas z_c y E^* :

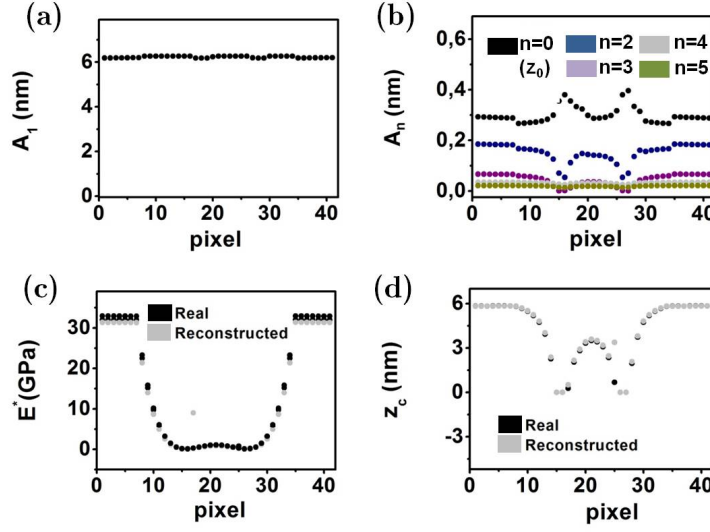


Figura 5.19: Valores simulados de (a) A_1 y (b) z_0 , A_2 , A_3 , A_4 y A_5 y comparación entre los valores introducidos en la simulación y los obtenidos a partir del método propuesto para la reconstrucción de (c) E^* y (d) z_c a una amplitud de trabajo $A_{sp} = 0.9A_0$ al escanear la muestra que se presenta en la figura 5.17a.

$$t_c = \frac{2}{\omega} \arccos \left(\frac{-A_1 + \sqrt{A_1^2 + 8A_2(A_2 - d_0 + z_0 + z_c)}}{4A_2} \right) \quad (5.50)$$

$$F_{\text{peak}} = \frac{4E^*}{3} \sqrt{R}(d_0 - d_{\min})^{3/2} \quad (5.51)$$

donde d_{\min} viene dado por la ecuación 5.11.

Se puede entonces resolver el sistema de ecuaciones 5.50-5.51 en cada píxel. Para ello es necesario incluir también los valores simulados de $A_1 = A_{sp}$ y deflexión z_0 en cada píxel. La inclusión de armónicos superiores como A_3 , A_4 y A_5 es recomendable para aproximar E^* de forma conveniente. En la figura 5.19a-b se presentan los valores que se introducen en el sistema y que, unidos a F_{peak} y t_c obtenidos en la sección anterior (figura 5.18c-d) permiten reconstruir la fuerza de interacción. Si comparamos los valores así obtenidos para E^* y z_c con los hallados a través de las simulaciones (figuras 5.19c-d) se observa que este método no supera un error relativo del 2.5 % en la estimación de E^* y del 2 % en la estimación de z_c .

5.5.5. Validez del método de reconstrucción de E^* en agua y aire

En esta sección presentaré la validez del método propuesto para la reconstrucción de la constante de acoplo de la fuerza repulsiva E^* del modelo DMT dependiendo de variables tales como el medio o el rango de valores de E^* .

En la figura 5.20 se presentan las reconstrucciones de F_{peak} , t_c , E^* y z_c para $Q = 4$ y $Q = 100$. Las reconstrucciones de F_{peak} y t_c son similares, si bien la reconstrucción de t_c tiene menos error en aire que en agua. Sin embargo, las reconstrucciones de E^* y z_c en aire y agua difieren, además de depender ostensiblemente del número de armónicos superiores considerado. En la figura 5.20c se muestra la comparación entre el módulo de Young efectivo introducido en las simulaciones y las correspondientes reconstrucciones considerando en la ecuación 5.11 dos, tres o cuatro armónicos. Si consideramos cuatro, el ajuste de E^* es muy bueno. El hecho de poder reconstruir E^* contando con las medidas experimentales de z_0 , A_2 , A_3 , A_4 y A_5 supone una ventaja fundamental respecto a otros métodos de reconstrucción de la fuerza, en el que el número de armónicos utilizado habría de ser al menos de 20 [192].

En la figura 5.20d se observa la validez de la reconstrucción de z_c . El error relativo en la estimación de z_c está entre un 0.2 y 2 % en agua y entre un 5 % para materiales duros y un 0.24 % para materiales blandos en aire. Sin embargo, la validez del ajuste en la reconstrucción de E^* es peor, ya que no sólo depende de la validez en la aproximación dada por la ecuación 5.11, sino que también depende del error en la reconstrucción de z_c . En particular, el error relativo calculado a partir de lo observado en la figura 5.20c es de un 20 %, 8 % y 2.5 % al incluir dos, tres o cuatro armónicos en el cálculo en materiales duros, mientras que en materiales blandos el error no depende del número de armónicos que se incluyan y siempre es de un 0.4 %. Este error es debido al error en la aproximación 5.11 para d_{min} . Sin embargo, las desviaciones de la reconstrucción de E^* respecto al real en aire son debidas a otro motivo, ya que no dependen del número de armónicos considerado: la gran variación de F_{peak} con z_c en el modelo DMT implica que un pequeño error en z_c se convierte en un gran error en E^* . Por esta razón se observa que en el caso de materiales duros existe un error relativo del 185 % y en materiales blandos es del 10 %.

De este estudio se puede concluir que el método propuesto para reconstruir E^* es correcto en líquidos. Cuanto más duro sea el material para el que se quiere reconstruir E^* más armónicos habrá que utilizar en el cálculo de d_{min} . En aire, el método tiene un gran error y no es recomendable para materiales duros. Además, incluso si este error no existiera, la dificultad de medir armónicos superiores en aire con la facilidad que se miden en líquidos hacen el método mucho menos práctico.

5.6. Resultados experimentales.

5.6.1. Adquisición de imágenes en ϕ , A_2 y x_0 en agua y aire

En esta sección presentaré las ventajas experimentales en relación a la toma de imágenes en canales auxiliares que existe en agua con respecto al aire. Las imágenes se han tomado con una micropalanca $k = 2 \text{ N/m}$ y $f_0 \approx 80 \text{ kHz}$ en condiciones estándar en líquidos ($A_0 \approx 6 \text{ nm}$ y $A_{sp} \approx 5.2 \text{ nm}$) y en condiciones de interacción fuerte en aire (la amplitud libre es alta: $A_0 \approx 140 \text{ nm}$ y $A_{sp} \approx 130 \text{ nm}$) sobre una muestra de membrana púrpura sobre mica. Las figuras 5.21a-b muestran lo que

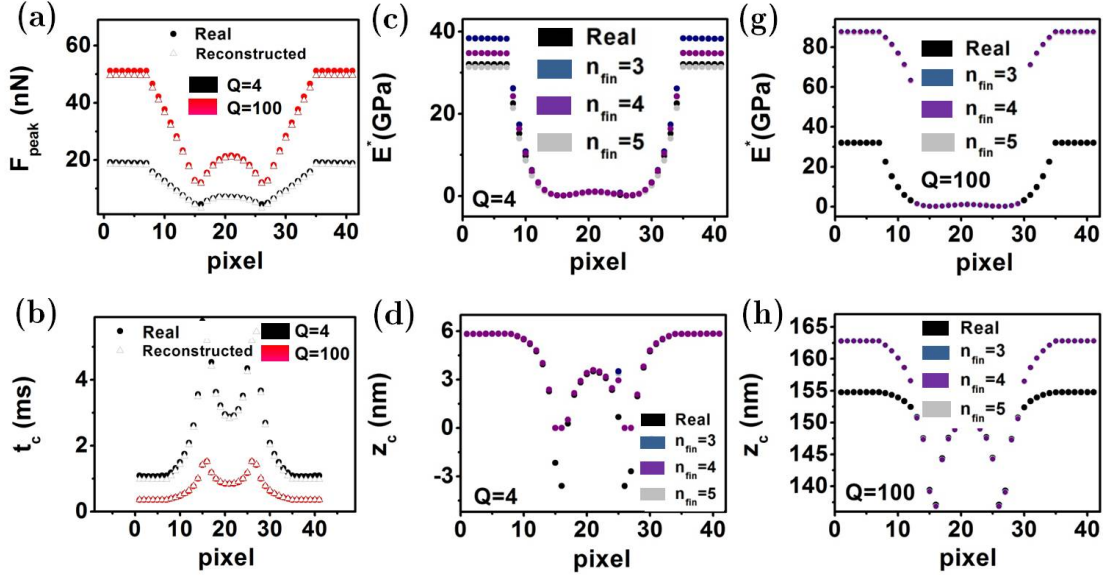


Figura 5.20: Comparación entre los valores simulados y los obtenidos a partir del método de reconstrucción propuesto con $A_{sp} = 0.9A_0$ y $F_0 = 6$ nN para (a) F_{peak} y (b) t_c para $Q = 4$ y $Q = 100$. Comparación entre los correspondientes valores obtenidos para E^* y z_c y los introducidos en la simulación para (c)-(d) $Q = 4$ y (e)-(f) $Q = 100$ al escanear la muestra que se presenta en la figura 5.17a.

las simulaciones predecían: en estas condiciones el segundo armónico es excitado y se puede tomar una imagen si la señal de referencia del lock-in auxiliar tiene la frecuencia de 2ω . Esto se manifiesta en un contraste entre la membrana púrpura y la mica en el canal de A_2 en ambos medios (véase figura 5.21a-b). Sin embargo, las condiciones en las que esto ocurren implican una A_0 mucho mayor para aire que para líquidos, por lo que el cociente A_2/A_1 es mucho mayor en líquidos.

De acuerdo a la expresión dada por la ecuación 4.8, el contraste en fase está relacionado con la energía disipada, la amplitud de trabajo y el cociente A_2/A_1 . Debido al bajo cociente A_2/A_1 en aire, la ausencia de contraste de fase en aire indica que la disipación es pequeña y el contraste en energía disipada nulo, mientras que en agua el contraste entre la membrana púrpura y la mica en el canal de fase es una consecuencia del alto cociente A_2/A_1 (véase figuras 5.21c-d).

Por otra parte, el contraste en el canal de deflexión x_0 en aire es inapreciable y en agua, aunque inestable, es significativo (véase figuras 5.21e-f). La inestabilidad es debida a que el canal deflexión está más influenciado por cambios en la dinámica de la micropalanca que no tienen relación con cambios en la fuerza de interacción. El contraste está de acuerdo con lo comprobado en simulaciones numéricas y presentado anteriormente en la figura 5.10. La expresión analítica hallada para x_0 a partir de la aproximación empírica $g_4(t)$ para F_{ts} viene dada por:

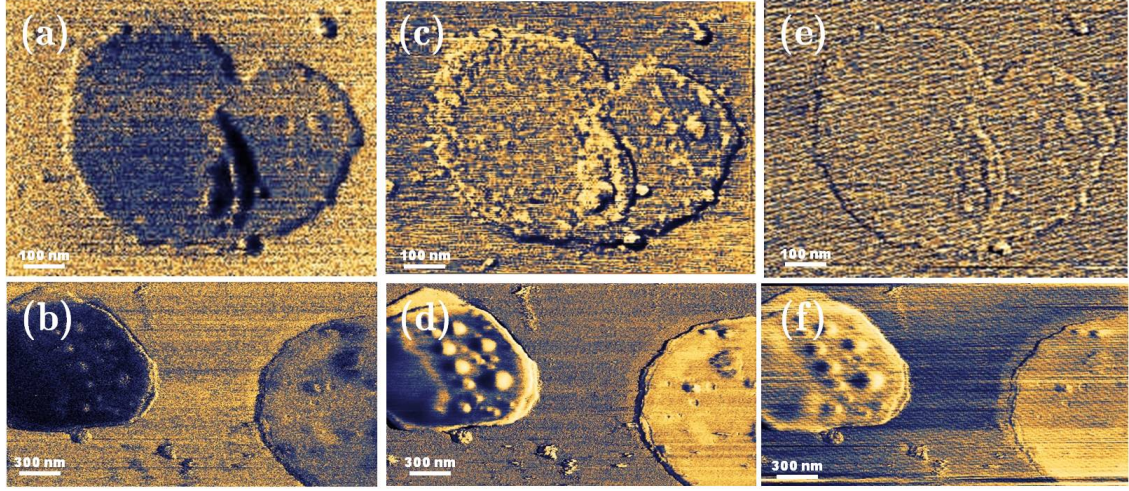


Figura 5.21: Imágenes en los canales de (a)-(b) A_2 , (c)-(d) ϕ_1 y (e)-(f) x_0 en (a),(c),(e) aire y (b),(d),(f) agua. En ambos medios existe contraste en el canal de A_2 . En aire, el caracter conservativo de la fuerza y el bajo valor del cociente A_2/A_1 bloquea el contraste en el canal de ϕ_1 . Sin embargo en líquidos, el cociente A_2/A_1 es alto y existe un contraste significativo en el canal de ϕ_1 .

$$x_0 = \frac{1}{Tk} \int_0^T F_{ts}(t) dt = \frac{\omega}{2\pi} \frac{F_{\text{peak}} t_c (4 + \pi)}{4\pi k} \quad (5.52)$$

La expresión 5.52 relaciona directamente x_0 con el producto $F_{\text{peak}} t_c$. Las simulaciones numéricas muestran que tanto en aire como en líquidos la fuerza máxima varía de forma similar con E^* , mientras que el tiempo de contacto no varía apenas con el módulo de Young efectivo de la muestra en aire, y sí lo hace en líquidos. La deflexión seguirá esta misma tendencia, y como consecuencia de ello el contraste en el canal deflexión en líquidos será mayor que en aire.

5.7. Conclusiones

En este capítulo se han investigado las causas y consecuencias de la generación de armónicos de la frecuencia de excitación en medios de factor de calidad bajo.

Las simulaciones numéricas sugieren una aparición adicional de un término estático de deflexión que se comporta como la amplitud del segundo armónico. Además, apuntan a que bajo las condiciones de fuerza de excitación constante, A_1/A_0 constante y $\omega = \omega_0$, los armónicos generados A_n en medios de $Q = 4$ y $Q = 100$ son similares. Sin embargo, el hecho de que A_0 dependa de Q provoca que la distorsión armónica de la señal A_n/A_0 sea mucho mayor en medios de Q bajo. Esto permite explicar la facilidad que existe para tomar imágenes en armónicos superiores en líquidos con respecto a aire. En particular, los armónicos generados para $F_0 = 6$ nN,

A_1/A_0 constante y $\omega = \omega_0$ en agua y en aire serían similares. Sin embargo, es más común medir con $A_0 = 6$ nm en agua que medir con $A_0 = 160$ nm en aire.

Aunque se puedan obtener magnitudes de A_n similares en ambos medios, el contraste que se obtendría para muestras de módulo de Young efectivo diferente se incrementaría en agua.

Se ha aproximado la fuerza máxima de interacción y el tiempo de contacto mediante fórmulas que dependen de x_0 , A_1 , A_n y de la distancia en la que entra la fuerza d_0 . Se ha obtenido también una aproximación para la fase de los armónicos superiores ϕ_n que es correcta para $Q = 100$ y se desvía ligeramente para $Q = 4$, lo que parece indicar que ϕ_n , además de depender de n y ϕ , depende también ligeramente de Q .

Para modelar el comportamiento de F_{peak} de forma correcta en aire es necesario incluir las contribuciones a la oscilación total de la deflexión z_0 y hasta el quinto de los armónicos superiores. Para modelar el comportamiento de t_c correctamente es suficiente incluir la deflexión x_0 y el segundo armónico A_2 . Esto también permite reproducir el decrecimiento asimétrico de la señal en medios de factor de calidad bajo a través del análisis de la contribución de cada armónico a la oscilación total.

La aproximación analítica al problema en base a teoría de perturbaciones considerando una fuerza cuadrática no reproduce lo obtenido en las simulaciones. Esto es coherente con el hecho de que tampoco reproduce las curvas de resonancia reales. Para reproducir las curvas experimentales es necesario incluir una fuerza cuadrática a trozos que no entraría en todo el ciclo, sino en una pequeña parte. Esto reproduce las curvas de resonancia de x_0 , A_n , A_1 y ϕ . Sin embargo, no ha sido posible obtener una solución analítica a este problema.

Al emplear métodos basados en cantidades promedio, sólo se tiene una ecuación que relaciona ϕ , A_{sp} , A_n y Q , pero serían necesarias ecuaciones adicionales para relacionar los observables con la constante de acoplo de la interacción. Sin embargo, la expresión permite explicar las ventajas de la adquisición de imágenes en armónicos superiores, ventajas que se reproducen experimentalmente y que se muestran en el apartado de resultados experimentales sobre una muestra biológica heterogénea.

La aproximación semi-analítica consiste en aproximar A_n por una función con una parte analítica y otra que se halla a partir de simulaciones numéricas. Permite explicar la atenuación que los armónicos superiores tienen a medida que n aumenta y que es mayor en agua que en aire, así como la dependencia de A_n en parámetros de la micropalanca como k , Q y ω_0 . La dependencia de A_n en la inversa de k y ω_0 maximiza en líquidos las amplitudes de los armónicos superiores A_n debido al uso generalizado de micropalancas blandas en líquidos.

La aproximación fenomenológica a la fuerza de interacción en función de los parámetros t_c y F_{peak} permite obtener una expresión analítica para x_0 y A_n . Estas fórmulas permiten la propuesta de un método de reconstrucción de la constante de acoplo de la fuerza de interacción a través de los canales experimentales.

Se ha probado a través de simulaciones que mediante la adquisición de imágenes en A_2 y A_3 es posible estimar t_c y F_{peak} tanto en agua como en aire con muy poco

error relativo ($<1\%$ para materiales blandos). A partir de estos dos parámetros, y utilizando las aproximaciones que las simulaciones numéricas permitieron hacer al principio del capítulo, se puede también hallar el módulo de Young efectivo de la muestra E^* y la distancia media z_c utilizando las imágenes en los canales de deflexión x_0 y armónicos superiores A_2 , A_3 y A_4 .

La validez del método de reconstrucción propuesto se restringe a la validez de las aproximaciones realizadas para t_c y F_{peak} .

La utilización de únicamente entre dos y cuatro armónicos en la reconstrucción de E^* supondría una mejora importante con respecto a los métodos existentes de reconstrucción de la fuerza, donde la mayor dificultad reside en que la adquisición de imágenes en armónicos de orden alto no es posible debido al ruido electrónico.

Generación de armónicos superiores en medios de factor de calidad bajo

Capítulo 6

Medida de las capas de solvatación sobre mica y redes de proteínas

6.1. Introducción

6.1.1. Fuerzas de solvatación

Las fuerzas de solvatación son el resultado de la estructuración que las moléculas de un líquido toman cuando éste está en contacto con un sólido. Cuando la distancia entre dos superficies que se aproximan es conmensurable con el tamaño de la molécula, las moléculas se estructuran en capas y la densidad es máxima. Cuando es incommensurable, las moléculas están más desordenadas y la densidad es mínima (véase figura 6.1a). De esta forma, el ordenamiento de las moléculas en capas sucesivas provoca una oscilación del perfil densidad con una periodicidad aproximada del tamaño de la molécula. En una primera aproximación, la presión correspondiente a las fuerzas de solvatación $P(d)$ en una interfase sólido-líquido puede ser descrita por una función oscilatoria que decae exponencialmente de la forma [19]:

$$P(d) \approx -k_B T \rho_s(\infty) \cos(2\pi d/\sigma) e^{-d/\sigma} \quad (6.1)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, $\rho_s(\infty)$ la densidad del líquido lejos de la superficie, σ el diámetro de la molécula y d es la distancia de separación entre las dos superficies.

El rápido decaimiento de este perfil indica la disminución del orden molecular a medida que nos alejamos de la superficie (véase figura 6.1b). Estas fuerzas no se pueden modelar a partir de teorías del continuo en las que las propiedades locales se corresponden con magnitudes macroscópicas, ya que cerca de las superficies estas propiedades oscilan, y es necesario recurrir a simulaciones de dinámica molecular. Cuando el líquido confinado es agua, las capas se denominan capas de hidratación y el mapa de fuerzas es más complejo debido a la presencia de dipolos y enlaces de hidrógeno. Las fuerzas de solvatación tienen gran importancia en tribología, a

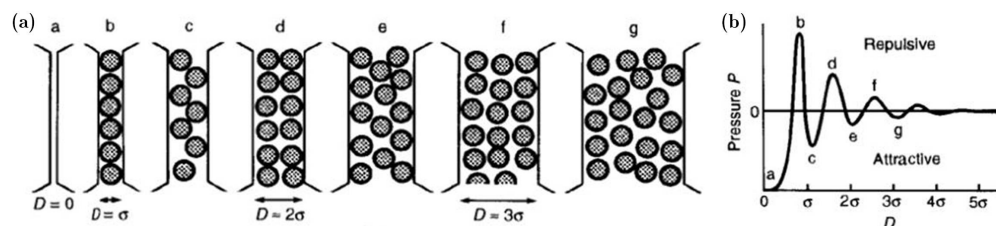


Figura 6.1: Esquema de la estructuración de las capas de solvatación debido al confinamiento y su correspondiente perfil de presión tal y como aparece en [19].

través del estudio y optimización de la lubricación sobre materiales [207], y en biología, donde las fuerzas de hidratación son esenciales para explicar las interacciones biomoleculares [208].

6.1.2. Revisión de la literatura

El equipo más comúnmente utilizado para medir este tipo de fuerzas es el Surface Force Apparatus (SFA) [19]. Consiste en dos cilindros que se aproximan y separan mientras se mide la fuerza de interacción a través de un muelle situado debajo de uno de ellos. El radio de los cilindros es de aproximadamente 1 cm, por lo que es de esperar que los resultados obtenidos utilizando este método y utilizando la microscopía de fuerzas sean algo diferentes debido a la diferencia en el área efectiva de contacto, que en microscopía de fuerza es de $10^{-4}\mu\text{m}^2$ y en SFA es de $100\mu\text{m}^2$.

Con SFA se han obtenido medidas de las fuerzas de solvatación en líquidos con un amplio rango de diámetros moleculares (desde moléculas de líquidos orgánicos como el octometilcyclotetrasiloxano (OMCTS) cuyo diámetro es de 8 Å, hasta moléculas de agua cuyo diámetro es de 2.6 Å) [19].

A lo largo de varios trabajos, O'Shea y colaboradores estudiaron las fuerzas de solvatación de alcanos lineales mediante AFM y obtuvieron resultados comparables a lo que se había obtenido a través de SFA hasta la fecha [90, 209, 210]. Los resultados fueron obtenidos tanto en modo estático, como utilizando la técnica de modulación en fuerza [90] y modos dinámicos con amplitudes muy pequeñas [209]. Resolvieron así hasta 7 capas de solvatación para los sistemas OMCTS/grafito y dodecanol/grafito.

Sin embargo, las medidas de las fuerzas de solvatación para alcanos no lineales (con muchas ramas) utilizando la microscopía de fuerzas ofrecieron dificultades. Las medidas con SFA realizadas anteriormente no mostraban un comportamiento oscilatorio y sí un comportamiento monótono [19] (véase figura 6.2a). Esto discrepaba de lo que predecían las simulaciones de dinámica molecular, donde las fuerzas de solvatación aparecían a una escala de nanómetros. En el año 2002, O'Shea y colaboradores estudiaron por microscopía de fuerzas, en concreto utilizando modos dinámicos, el comportamiento de alcanos no lineales. En particular, encontraron fuerzas oscilatorias para el escualano (véase figura 6.2c) y lo atribuyeron al ordenamiento a pequeña escala de estas moléculas [210]. Su falta de ordenamiento a gran

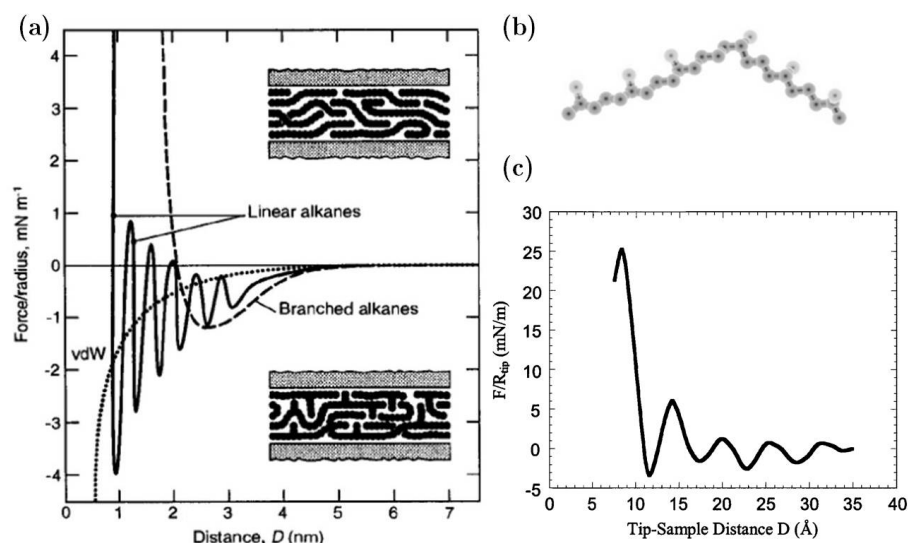


Figura 6.2: (a) Resultados experimentales de la medida de las fuerzas de solvatación de alcanos lineales y no lineales utilizando SFA tal y como aparece en [19]. (b) Esquema de la molécula de escualano como ejemplo de molécula sin orden a gran escala (c) Resultados experimentales de la medida de las fuerzas de solvatación de moléculas de escualano utilizando AFM tal y como aparece en [210].

escala, unida al gran área de interacción que la medida por SFA conlleva de forma intrínseca, sería entonces la responsable de que este comportamiento no hubiera podido ser visualizado utilizando SFA.

A pesar de su importancia, las medidas de las capas de solvatación sobre agua (capas de hidratación) llegaron más tarde debido a las dificultades experimentales que introducen sus moléculas de pequeño tamaño, largo momento dipolar y afinidad con el hidrógeno. El pequeño tamaño de la molécula de agua (2.6 Å) es un factor fundamental, puesto que para ser capaz de medir estas fuerzas en modo dinámico la amplitud de oscilación ha de ser menor que la longitud característica de la fuerza, que es del orden del tamaño de la molécula. De otra forma, la fuerza se promediará, perdiéndose el comportamiento oscilatorio. Hoh observó experimentalmente cambios discretos en la adhesión entre una punta de nitruro de silicio y vidrio, y sugirió que podrían ser debidos a los mínimos en la fuerza producidos por las capas de hidratación [211].

Cleveland y colaboradores midieron indirectamente el potencial de las capas de hidratación sobre cristales de calcita y barita analizando el espectro de ruido térmico de una micropalanca sumergida en agua [212]. Observaron saltos de la punta entre cuatro estados y de ahí infirieron el potencial de interacción. Los mínimos de este potencial estaban espaciados entre 1.5 y 3 Å, una distancia parecida al tamaño de la molécula de agua.

Es necesario destacar también el trabajo de Hoffmann y colaboradores, que a lo largo de varios años y sucesivos trabajos han estudiado el comportamiento vis-

coelástico del agua confinada. Obtuvieron resultados directos de la elasticidad y disipación de una disolución acuosa confinada entre la punta de la micropalanca y mica utilizando amplitudes muy pequeñas (0.36 Å) e interferometría óptica para medir los desplazamientos [11]. Encontraron que el desfase entre disipación y elasticidad cambia a medida que la punta se acerca a la superficie (véase figura 6.3a). Este ralentizamiento en la dinámica del sistema a medida que la separación se reduce es un indicio de que a medida que están más cerca de la superficie las capas de hidratación se comportan más como un sólido que como un líquido. Más tarde estudiaron bajo qué condiciones se observa este comportamiento [213], aclarando en cierta medida la controversia que existe en torno al comportamiento del agua confinada como un fluido viscoelástico [214, 215, 216].

Las capas de hidratación son esenciales para la compresión de las interacciones entre proteínas. En el año 2000, Jarvis y colaboradores obtuvieron medidas directas en modo dinámico usando puntas de nanotubos de carbono para medir las capas de hidratación de monocapas autoensambladas hidrofílicas de (COOH(CH₂)₁₀-SH sobre Au(111) [217]. Utilizaron amplitudes altas (entre 2 y 3.7 nm) y frecuencias cercanas a la de resonancia para aumentar la sensibilidad. Además, cuantificaron los resultados utilizando el método de reconstrucción de la fuerza de Sader [178]. Obtuvieron seis oscilaciones correspondientes a seis capas de hidratación con una periodicidad correspondiente al diámetro de la molécula de agua y una disipación que se incrementaba al acercar la punta a la muestra. El espaciado decrecía en las proximidades de la superficie debido a los enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilo y las moléculas de agua. De esta forma diferenciaron este ordenamiento (que implica fuerzas atractivas además de un simple efecto de confinamiento) del que se observaba cuando el líquido era octano. En el caso del octano el efecto era únicamente geométrico (véase figuras 6.3b-c), ya que el hecho de que el espaciado de la primera capa aumente es únicamente debido a la ligadura geométrica plano-esfera que no existe en la capas siguientes en las que la frontera es esfera-esfera [217].

Existen también algunos estudios experimentales de las capas de solvatación utilizando la técnica de modulación en amplitud y moléculas de líquidos orgánicos [103, 218]. En 2006, se midieron capas de solvatación con amplitudes de oscilación de 0.8 Å, diez veces menor que el tamaño de las moléculas (8 Å) de esos experimentos y se encontró un comportamiento oscilatorio de la viscosidad [218]. Recientemente, han aparecido trabajo teórico-experimentales muy interesantes que estudian las fuerzas de solvatación utilizando la técnica de modulación en amplitud. Sissi de Beer y Mugele [103] estudiaron el comportamiento de estas fuerzas con la frecuencia y con la amplitud libre, utilizando un modelo lineal para la fuerza ($F_{ts}(x) = k_{int}x$) y ajustando la constante k_{int} a la expresión:

$$k_{int}(z_c) = K_{int} \cos\left(\frac{2\pi z_c}{\sigma}\right) e^{-z_c/\xi} \quad (6.2)$$

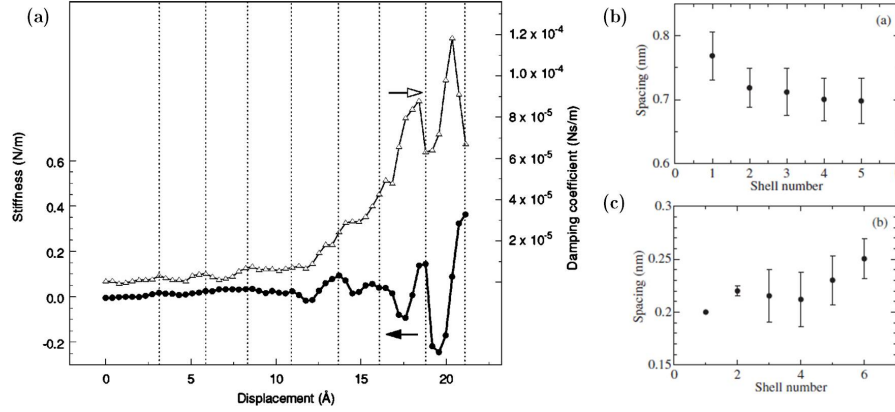


Figura 6.3: (a) Elasticidad y disipación sobre una muestra de mica en agua tal y como aparece en [11]. Espaciamento entre las capas de solvatación en (b) agua y (c) OMCTS tal y como aparecen en [217].

donde el parámetro K_{int} es una medida de la magnitud de las fuerzas de solvatación, σ es el diámetro de las moléculas confinadas, ξ la distancia de decaimiento y z_c la distancia media entre la punta y la muestra. Para poder comparar este valor con el obtenido a partir de SFA [19] es necesario utilizar amplitudes de oscilación más pequeñas que el diámetro de la molécula. De esta forma la amplitud F/R de la fuerza oscilatoria se podría obtener a partir de K_{int} utilizando la relación [103]:

$$F/R = \frac{K_{\text{int}}}{2\pi R \sqrt{\frac{1}{2\pi\sigma} + \frac{1}{\sigma}}} \quad (6.3)$$

Una de las ventajas fundamentales de utilizar la microscopía de fuerzas para la medida de las fuerzas de solvatación es su habilidad de poder obtener una imagen de alta resolución de la muestra sobre la que se están estudiando. En el año 2007, Fukuma y colaboradores combinaron ambas cosas [219], pero no fue hasta el 2010 cuando implementaron un método conocido como microscopía de fuerzas tridimensional (3D-SFM - three dimensional scanning force microscopy) que permite en menos de un minuto la adquisición simultánea de una imagen de topografía, las capas de solvatación de la muestra en los planos verticales e imágenes en los planos horizontales que cortan cada una de estas capas [220]. Esto posibilita el estudio del ordenamiento lateral de las moléculas del líquido (véase figura 6.4a), que combinado con la resolución atómica que su montaje experimental permite, da un paso más en el estudio de las capas de hidratación tanto para la nanotribología como para la biología. Yamada y colaboradores también han implementado una técnica similar [221]. Ambos lo han hecho empleando el microscopio de fuerzas en modulación en frecuencia.

Las ventajas más importantes del uso de la microscopía de fuerzas para la medida de las fuerzas de solvatación son la posibilidad de combinar el posicionamiento en la muestra con la medida de las capas de solvatación y la posibilidad de investigar

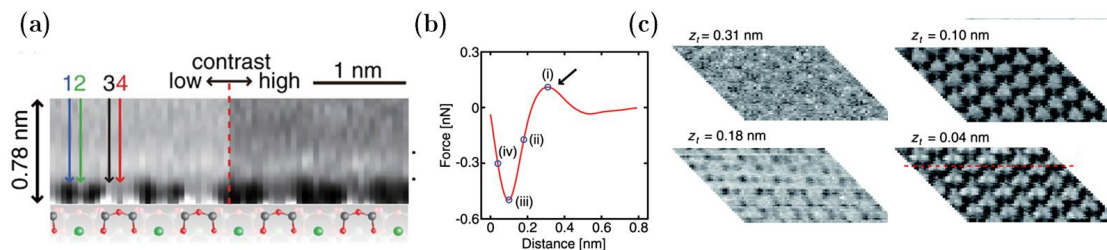


Figura 6.4: (a) Sección en el plano xz que muestra las capas de solvatación de una disolución acuosa en mica, (b) promedio de la fuerza media obtenida en la imagen de acuerdo al método de reconstrucción de Sader [178] (c) Secciones en el plano xy para distintos puntos en el eje z tal y como aparecen en [220].

a escala nanométrica estas interacciones. Los inconvenientes que esta técnica conlleva son fundamentalmente dos. Por una parte, uno de los problemas inherentes a las medidas de las capas de solvatación mediante microscopía de fuerzas es la falta de un cero en la distancia, de tal forma que no es posible afirmar que hay más capas que no están siendo penetradas por la punta de la micropalanca [149]. Esto lo veremos con más detalle en las secciones 6.4.2 y 6.5.3. Por otra parte, la dependencia de las medidas de las capas de solvatación en la punta de la micropalanca utilizada. Existe una incertidumbre en torno a si estamos viendo las capas de solvatación características de una interfase o las modificadas por el confinamiento entre nuestra punta y la superficie. Además, también es difícil determinar la estructura y composición exacta de la punta, por lo que se debería hacer hincapié en la caracterización de ésta antes y después de las medidas. Esto se tratará con más detalle en el apartado 6.5.5.

6.1.3. Objetivos

En este capítulo presentaré la medida de capas de solvatación utilizando la microscopía bimodal [118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128]. Para ello primero es necesario conocer los factores experimentales esenciales para la medida de estas capas y su implementación en el montaje utilizado. El objetivo fundamental del capítulo es combinar la técnica bimodal con la tridimensional, de forma que se pueda obtener un mapa en tres dimensiones de las capas de solvatación sobre las muestras en los canales bimodales. Se intentará primero obtener resultados sobre la mica y comparar con lo obtenido mediante las técnicas de modulación en frecuencia, para luego aplicarlo a una muestra no estudiada hasta la fecha. Para ello se realizarán experimentos sobre la red de GroEL en PBS (esta red ya fue presentada en el capítulo 3) y se estudiarán las diferencias con respecto al caso de una superficie no biológica y plana a nivel atómico como es la mica.

6.2. Microscopía de fuerzas bimodal en modo tridimensional: montaje experimental

En la microscopía de fuerzas tridimensional (3D-SFM, three dimensional scanning force microscopy) [43, 220, 222, 223], la punta recorre el plano xy paralelo a la muestra y el eje z que lo corta transversalmente. En particular, Fukuma y colaboradores [220] han implementado la microscopía de fuerzas tridimensional en líquidos. Esto es posible modulando la distancia entre la punta y la muestra a la vez que la punta escanea lateralmente. Además, la distancia media punta-muestra se regula para mantener la magnitud deseada constante. Esta técnica ha sido aplicada manteniendo constante el cambio en la frecuencia de resonancia [220], pero en principio el montaje es válido y funciona correctamente si se mantiene constante otra magnitud. El montaje experimental correspondiente a la combinación entre la microscopía de fuerzas bimodal y la microscopía de fuerzas tridimensional se puede ver en la figura 6.5. La novedad respecto al esquema presentado en la microscopía bimodal en modulación en amplitud es la modulación de la oscilación de la muestra en z a medida que se escanea la muestra lateralmente en el plano xy. Los experimentos presentados en esta sección se han realizado en el laboratorio del Profesor Fukuma (Universidad de Kanazawa, Japón) en un microscopio en el que se ha optimizado el ruido electrónico (hasta obtener una densidad de ruido de $n_{zB} \approx 40\text{fm}/\sqrt{\text{Hz}}$ en líquidos) [6]. Un microscopio convencional tiene aproximadamente 50-100 veces más (véase apéndice A).

La frecuencia de la modulación en z es de 200 Hz para las imágenes de 512 píxeles en z y de 98 Hz para las de 256 píxeles. La velocidad lateral es de 12 nm/segundo. Cada perfil en el plano xz se obtuvo en 0.32 s. Las imágenes suelen tener 64x64 píxeles en xy y el rango en nanómetros que se cubre depende de la dimensión de la muestra a observar (4 nm para las mica, 60 nm para el GroEL). El hecho de tener disponibles datos tridimensionales hace posible el disponer de cortes a lo largo de planos arbitrarios. En particular, si se utiliza la técnica para la medida de las capas de solvatación, los cortes en los planos yz y xz muestran el ordenamiento vertical de las moléculas. Cada punto de estos perfiles tiene asociado un corte en el plano xy (véase figura 6.5) que muestra, de haberlo, el ordenamiento horizontal de las moléculas. De esta forma es posible estudiar si las moléculas del solvente pertenecientes a las capas de solvatación tienen también un ordenamiento asociado que imita el ordenamiento del sustrato sobre el que están o no. Además, es posible promediar los perfiles en cada uno de los cortes o en la imagen completa, y obtener así una curva promediada de la magnitud deseada (A_1 , A_2 , ϕ_1 o ϕ_2) frente a z_c que facilita la interpretación y el análisis de los resultados experimentales obtenidos. Asimismo, se dispone también de una imagen bidimensional, ya que el montaje experimental utilizado posibilita mantener la magnitud deseada (cambio en la frecuencia de resonancia medio, amplitud media) constante en cada píxel mientras se toma la imagen tridimensional.

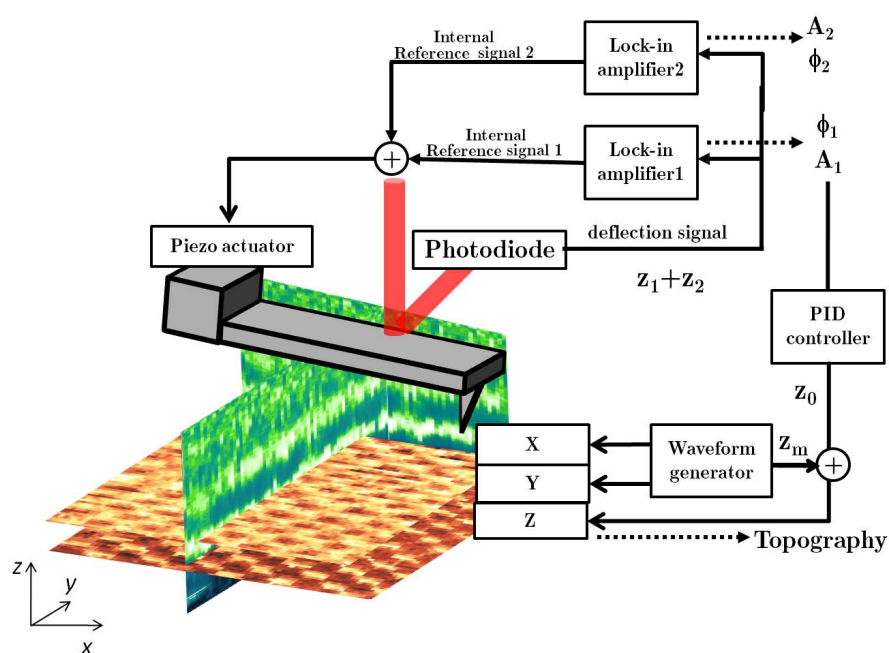


Figura 6.5: Esquema del montaje experimental utilizado para implementar la microscopía de fuerzas bimodal tridimensional. La novedad frente a la microscopía de fuerzas bimodal (véase figura 3.1 de la página 59) es la modulación en z a medida que la imagen es adquirida.

6.3. Requisitos del montaje experimental para la medida de capas de hidratación.

La medida experimental de las capas de hidratación mediante microscopía de fuerzas precisa la minimización del ruido electrónico y de la amplitud libre. Para ello es necesario la incorporación de varios elementos en el montaje experimental.

Filtro paso-banda

Se ha utilizado un filtro paso-banda para eliminar los componentes no deseados de la oscilación [6]. Un filtro paso banda está caracterizado por una frecuencia central, una ganancia y un factor de calidad. La frecuencia central del filtro utilizado es variable, de tal forma que el filtro se puede adaptar a los experimentos realizados con micropalanca de frecuencia de resonancia distintas.

La ganancia del filtro es un factor esencial, ya que para medir las capas de hidratación es preciso minimizar el ruido electrónico. Se ha comprobado experimentalmente que si la amplitud de excitación es superior a 100 mV las capas de hidratación no se observan. En la figura 6.6a-b se observan las capas de hidratación correspondientes a una micropalanca de silicio con punta de silicio (PPP-NCH: Nanosensors, $f_0 \approx 123$ kHz y $k \approx 40$ N/m) que oscila en PBS sobre mica. Se puede ver cómo para una ganancia de x1 las capas de hidratación no son detectadas, mientras que sí lo son cuando se aumenta la ganancia del filtro paso banda de x1 a x5, lo que equivale a disminuir cinco veces la amplitud de excitación necesaria para conseguir la misma amplitud de oscilación $A_0 \approx 150$ pm. Este comportamiento ha sido observado en todos los experimentos. Sin embargo, la ganancia del filtro, que es necesaria para la medida de las capas de hidratación, conlleva también un empeoramiento de la imagen simultánea de topografía. En particular, en las figuras 6.6c-d se puede ver cómo la introducción de la ganancia dificulta la observación de la periodicidad de la red de mica.

El factor de calidad del filtro paso-banda proporciona el rango de frecuencias a filtrar. Depende de la frecuencia f_0 y del ancho de banda ΔB de acuerdo a:

$$Q = \frac{f_0}{\Delta B} \quad (6.4)$$

Cuanto más grande sea su factor de calidad más selectivo será el filtro. El factor de calidad Q no tiene una influencia tan decisiva como la tenía la ganancia en la detección de las capas de hidratación. El único requisito es que sea mucho menor que el de la micropalanca para no afectar a su curva de resonancia.

Pico de resonancia

Es preciso que la respuesta en frecuencia de la micropalanca no tenga picos espúreos, ya que éstos dan lugar a oscilaciones del fluido en la celda no deseadas que

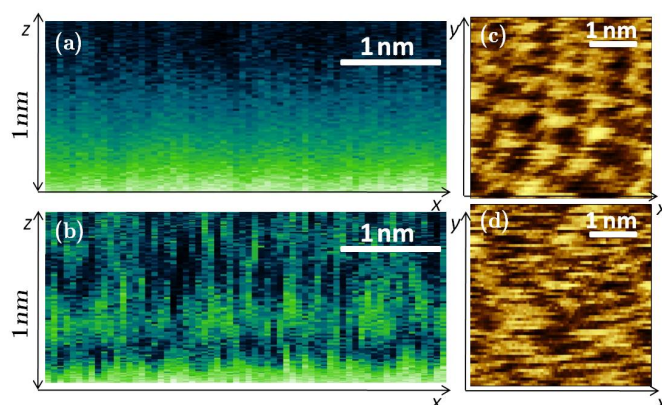


Figura 6.6: Perfil en el eje xz con ganancias del filtro paso banda de (a) x1 y (b) x5, y (c)-(d) correspondientes imágenes topográficas obtenidas al mantener el valor medio de la amplitud $\langle A_1 \rangle$ constante en cada píxel.

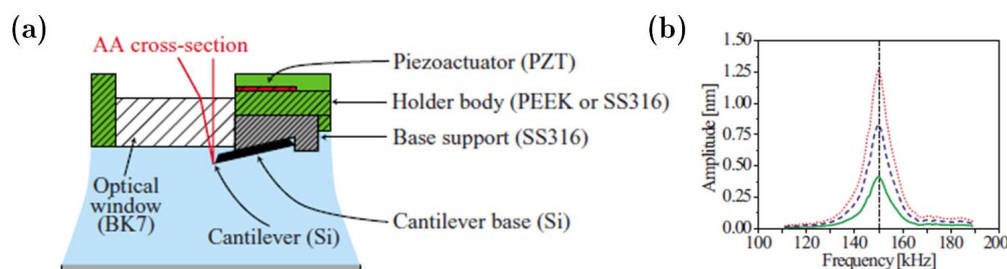


Figura 6.7: (a) Celda de líquidos utilizada y (b) curva de resonancia de la micropalanca en líquidos para diversas amplitudes de oscilación tal y como aparecen en [224]

pueden inestabilizar la medida. Si bien la existencia de picos espúreos en el espectro es compatible con la adquisición de imágenes topográficas de la muestra, no lo es con la medida de las capas de hidratación, cuya detección requiere una sensibilidad mayor. En este caso, si bien se ha utilizado un piezoeléctrico (excitación acústica) para hacer oscilar la micropalanca, lo que da lugar a picos adicionales que no se corresponden con el de resonancia de la micropalanca, también se ha trabajado con una celda modificada. Esta celda ha sido modificada con PEEK (un tipo de polímero) [224] (véase figura 6.7a) para así evitar la transmisión de las vibraciones acústicas al fluido en la celda. En la figura 6.7b se observa el pico correspondiente a una micropalanca de 20 N/m y frecuencia de resonancia 150 kHz (PPP-NCH: Nanosensors). La acción combinada de la celda modificada y el filtro paso-banda dan lugar a un pico único de la micropalanca como el que corresponde a una curva de resonancia canónica (véase figura 2.3c de la página 43).

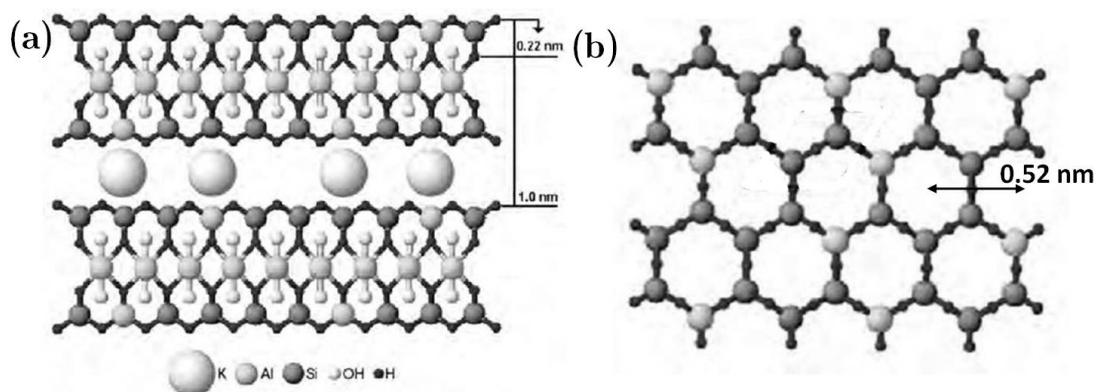


Figura 6.8: (a) Esquema de la distribución de los átomos en la mica en el plano (a) xz y en el plano (b) xy . La periodicidad de la red hexagonal es de 0.52 nm, y cada plano está separado del siguiente una distancia de aproximadamente 1 nm.

Constante elástica del sistema

La constante elástica del sistema también es un factor importante para la medida experimental de las capas de hidratación. Hemos intentado trabajar con micropalanca blanda ($k_1 \approx 0.2 - 1$) N/m sin conseguir resultado alguno, ya que la micropalanca se queda pegada a la muestra cuando intentamos modular el piezoeléctrico en z y desplazarnos a lo largo del plano xy . En el rango de constantes de fuerzas entre 10–30 N/m sí es posible tomar una imagen tridimensional pero no se observan las capas de hidratación. Sin embargo, con micropalanca más duras ($k_1 \approx 40$ N/m) generalmente es posible obtener imágenes de las capas de hidratación.

6.4. Resultados experimentales sobre mica

La mica muscovita o aluminosilicato de potasio $\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$ (véase figura 6.8) es un sustrato muy común a la hora de realizar medidas de microscopía de fuerzas para la deposición de biomoléculas. Esto es debido a que tiene grandes superficies planas a escala atómica y a sus propiedades eléctricas. Su estructura permite limpiar esta superficie mediante exfoliación, de tal forma que su uso es sencillo y rápido. Al exfoliar la mica, los iones K^+ se quedan en la superficie. Si luego se sumerge en un líquido polar, estos iones se escapan y los átomos del plano expuestos son aquellos de la red hexagonal de silicio y oxígeno (véase figura 6.8b). Además, átomos de silicio son reemplazados por átomos de aluminio en una proporción de 3 a 1 [221].

A lo largo de esta sección se intentarán analizar las características de las capas de hidratación sobre mica en PBS. El hecho de que la mica sea hidrofílica implica que el ordenamiento de las moléculas del líquido no sólo es debido al confinamiento,

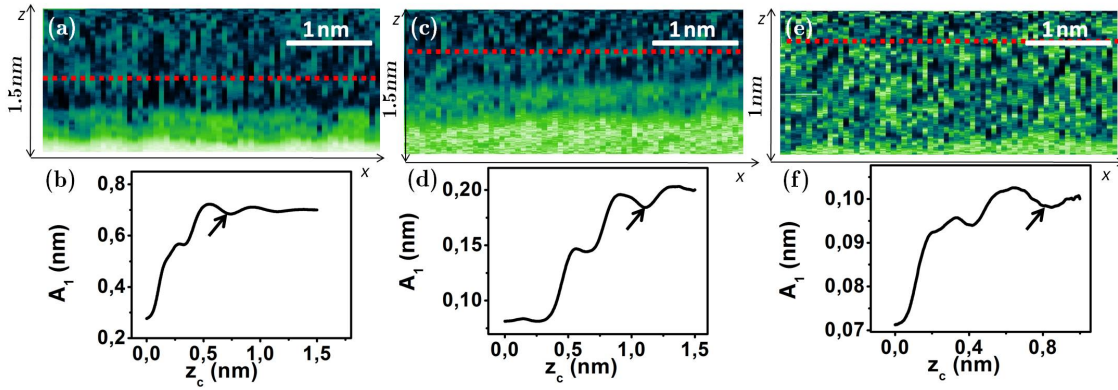


Figura 6.9: Perfil en el plano xz para (a) $A_{01} \approx 70$ pm, (b) $A_{01} \approx 20$ pm y (c) $A_{01} \approx 10$ pm. (d)-(f) Correspondientes perfiles A_1 frente a z_c promediados en la imagen completa. Las líneas punteadas rojas en (a)-(c) corresponden a la capa de hidratación señalada en (d)-(f) por flechas.

sino que también existe una atracción de las moléculas de agua a la superficie de la mica. Para analizar este efecto, se estudiarán las capas variando diversos parámetros.

6.4.1. Comportamiento al variar la amplitud libre.

Se ha comprobado experimentalmente que la medida de las capas de hidratación mejora a medida que la amplitud libre A_{01} aumenta siempre y cuando esté por debajo de un umbral. Si A_{01} sobrepasa este umbral, bien las capas de hidratación se promedian hasta hacerse imposibles de detectar, o bien el incremento en F_0 que el incremento en A_{01} conlleva aumenta el ruido electrónico e imposibilita la medida. El umbral parece depender del tipo de micropalanca utilizada y de la punta de la misma.

Mientras que A_{01} no sobrepase el umbral, el hecho de aumentar A_{01} tiene dos efectos. Por una parte, facilita el que la punta no se quede pegada mientras se modula en el eje z y se desplaza lateralmente a una alta velocidad. Por otra, incrementa la relación señal/ruido del canal. En la figura 6.9 se observa cómo al disminuir A_{01} desde 70 pm hasta 10 pm, el ruido electrónico aumenta y las capas de hidratación dejan de ser detectadas en los cortes correspondientes a los planos xz. Sin embargo, la posibilidad de promediar los perfiles de A_{01} frente a z_c en la imagen completa (véase figura 6.9f) aumenta la relación señal/ruido de tal forma que las capas de hidratación pueden ser detectadas.

6.4.2. Comportamiento al variar $\langle A_1 \rangle$

Existe una magnitud que se mantiene constante mientras se toma la imagen tridimensional y que proporciona una imagen de topografía además de la imagen

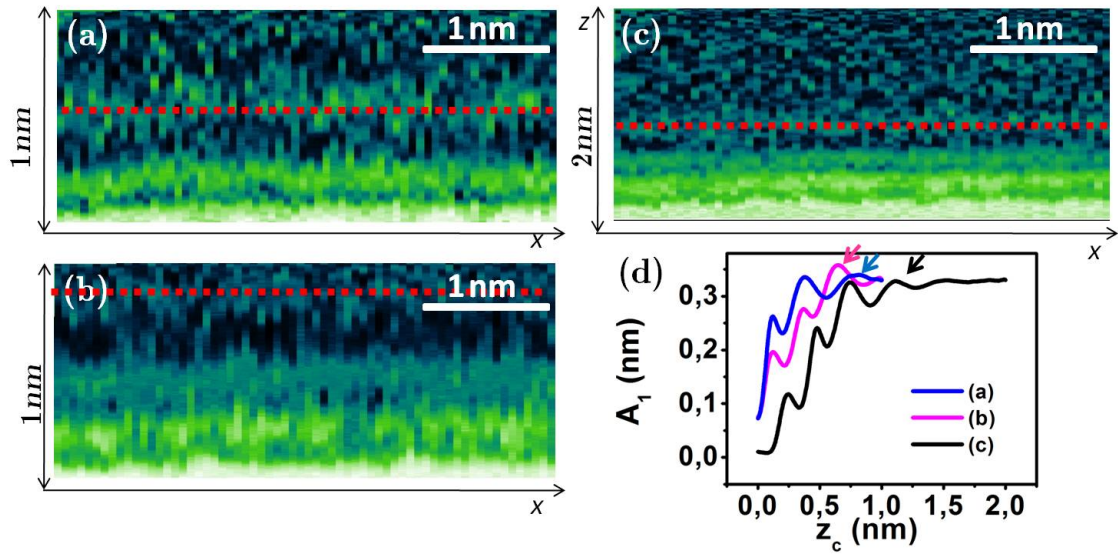


Figura 6.10: (a)-(c) Perfil en el plano xz para distintos valores de $\langle A_1 \rangle$ y (d) correspondientes perfiles promediados A_1 frente a z_c . Las líneas punteadas rojas en (a)-(c) corresponden a la capa de hidratación indicada por flechas en (d).

tridimensional desglosada en planos yz, xz y xy. Esta magnitud es en nuestro caso el valor medio de A_1 ($\langle A_1 \rangle$) en cada píxel en xy y controla la porción de la muestra que examinamos. A medida que disminuimos $\langle A_1 \rangle$ en la imagen, la distancia entre la punta y la muestra disminuye y se escanea más porción de la muestra, mientras que cuando $\langle A_1 \rangle$ aumenta, la distancia punta-muestra es mayor y se registra una región más alejada de la superficie. Por esta razón, para el mismo desplazamiento en el eje z (por ejemplo, 1.5 nm), más porcentaje se verá de las capas de hidratación y menos de la muestra cuanto mayor sea $\langle A_1 \rangle$. Esto es importante a la hora de interpretar los datos experimentales. Existen ocasiones en las que viendo únicamente el perfil en xz intentamos comparar dos imágenes, cuando lo que estamos comparando no corresponde a las mismas capas de hidratación. Por ello es recomendable disponer de una imagen de más rango en z. Esto se aprecia si intentamos comparar las figuras 6.10a y 6.10b, tomadas con $\langle A_1 \rangle$ diferente y con el mismo rango en z (1 nm). No se encuentran semejanzas apreciables entre ambas imágenes. Sin embargo, en el caso de tener una imagen de mayor rango (2 nm) (véase figura 6.10c) se puede intuir que la imagen de la figura 6.10a se tomó con $\langle A_1 \rangle$ mayor que la de la figura 6.10b y que lo que se observa en ella son las capas de hidratación y no la superficie. En la figura 6.10d se observan los perfiles de A_1 frente a z_c promediados en las imágenes. El perfil correspondiente a 6.10a y 6.10b se corresponden con rangos diferentes en el perfil correspondiente a 6.10c.

6.4.3. Comparación entre los canales de amplitud y fase

También se ha comparado la sensibilidad de los canales de A_1 y ϕ_1 en la medida de capas de hidratación. En las figuras 6.11a-b se muestran los perfiles en el plano xz para ambos canales y en la figura 6.11c-d se muestra las correspondientes curvas de fuerzas de A_1 y ϕ_1 frente a z_c promediadas en la imagen completa. Mientras que la amplitud sólo oscila 20 pm en la capa de hidratación señalada por la línea punteada en 6.11a-b y la flecha en 6.11c-d, la fase lo hace aproximadamente 20° . Estos resultados están de acuerdo con los trabajos de medidas de capas de hidratación utilizando los canales de amplitud y fase del primer modo. En particular, estos valores son del mismo orden de magnitud que los observados por Sissi de Beer y Mugele [103] cuando la frecuencia de oscilación es la de resonancia de la micropalanca. Además, si estudiamos el corte correspondiente a esta capa en el plano xy se observa una resolución lateral distinta. La imagen de A_1 (figura 6.11e) no muestra la red hexagonal que aparece en la imagen de ϕ_2 (figura 6.11f). Esto es debido a que el canal de A_1 está más afectado por el ruido, lo que resulta en un promedio de los átomos de silicio de la red que sin embargo, se pueden resolver en la imagen de ϕ_1 (véase el esquema de la figura 6.14a-b). Esto es debido a que la relación señal-ruido es mucho mayor para la fase. Es posible comparar el ruido de los canales de amplitud y fase durante una imagen partiendo de la densidad de ruido obtenida en base al espectro de ruido térmico (véase apéndice A). Suponiendo un ruido del microscopio de $40 \text{ fm}/\sqrt{\text{Hz}}$ y que el ancho de banda del lock-in es de 2 kHz, el ruido en mV para las micropalancas utilizadas es de 0.09 mV. Esto equivale a un ruido σ en fase de 0.0016° y en amplitud de 0.9 pm. La relación señal/ruido de ambos canales viene dada por:

$$\text{SNR}(A_1) = \frac{\Delta A_1}{\sigma(A_1)} \quad (6.5)$$

$$\text{SNR}(\phi_1) = \frac{\Delta \phi_1}{\sigma(\phi_1)} \quad (6.6)$$

Cuando el contraste de amplitud ΔA_1 y fase $\Delta \phi_1$ son los correspondientes a la capa de hidratación señalada por líneas punteadas en las figuras 6.11a-b y por flechas en las figuras 6.11c-d en, la relación señal/ruido de la fase es aproximadamente 560 veces mayor que la de la amplitud.

6.4.4. Espaciamento de las capas

En la figura 6.12 se muestra la comparación entre curvas de A_1 frente a z_c para diversos puntos en el eje x y la curva promediada a partir de la imagen completa. En la curva promediada se mide una periodicidad de aproximadamente 0.41 nm, mayor que el tamaño de la molécula de mica. Esto es debido a que el hecho de calcular el espaciamento sobre la curva promediada nos lleva a sobreestimar el valor de la periodicidad de la oscilación.

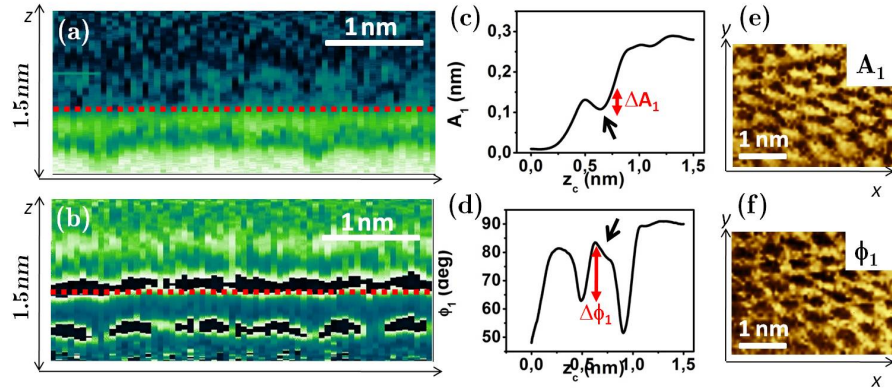


Figura 6.11: Perfil en el plano xz en los canales de (a) A_1 y (b) ϕ_1 y correspondientes curvas promediadas (c) A_1 y (d) ϕ_2 frente a z_c . (e)-(f) Comparación entre la resolución obtenida en los cortes en el plano xy en los canales de A_1 y ϕ_1 para los valores en el eje z indicados por líneas punteadas en (a)-(b) y por flechas en (c)-(d). ΔA_1 y $\Delta \phi_1$ indican el contraste de amplitud y fase sobre la correspondiente capa de hidratación.

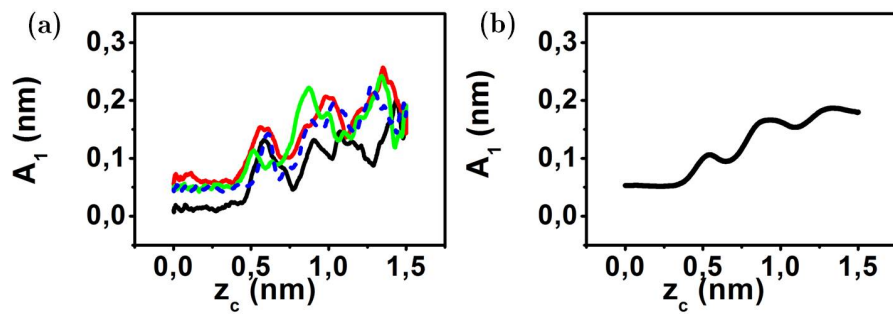


Figura 6.12: (a) Curvas de A_1 frente a z_c para distintos valores en el eje x y el mismo valor en el eje y . (b) Curva A_1 frente a z_c promediada en la imagen.

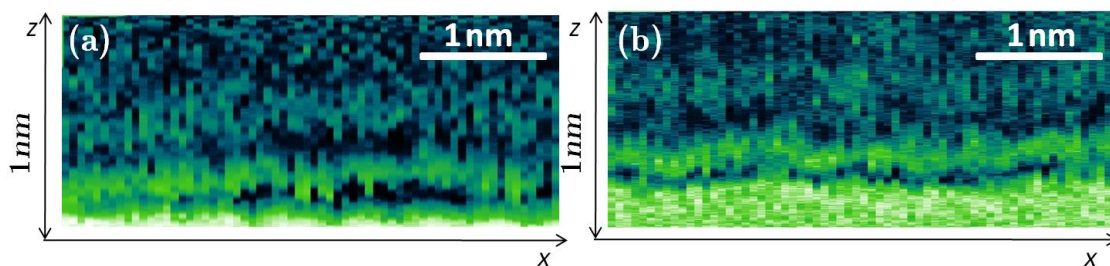


Figura 6.13: Perfil en el plano xz en el canal de A_1 para una micropalanca de constante de fuerzas $k \approx 40$ N/m medida con una punta de (a) nitruro de silicio y (b) silicio.

La curva media es sin embargo muy útil a la hora de reconstruir la fuerza de interacción entre punta y muestra, puesto que así se evita la influencia de picos y otros artefactos debido al ruido.

6.4.5. Dependencia en la composición de la punta

En la figura 6.13 se observa la comparación entre las capas de hidratación correspondientes a una micropalanca de dureza similar y distinta composición. Para ello, además de utilizar puntas de silicio (PPP-NCH: Nanosensors, $k \approx 40$ N/m), se han utilizado puntas de silicio recubiertas de nitruro de silicio (Mikromasch NSC, $k \approx 40$ N/m), un material más inerte e hidrofóbico. Las capas de hidratación sobre la mica no muestran un comportamiento muy diferente. Si bien las capas parecen ser más estables para el caso de la punta de silicio. Esta estabilidad podría ser debido a las propiedades de los distintos materiales, pero también a que las puntas son de tamaños y características diferente. En cualquier caso, lo que sí se observa es que el número de capas y el espaciamiento entre ellas es similar. Esto puede indicar que las capas de hidratación en este caso están dependiendo muy fuertemente del confinamiento y no de la hidrofiliidad/hidrofobicidad de los materiales.

6.5. Aplicación de la microscopía de fuerzas bimodal

El objetivo de combinar la microscopía de fuerzas bimodal con la microscopía de fuerzas tridimensional (3D-SFM) es el de aumentar la sensibilidad y resolución lateral de las imágenes. Como hemos visto en el capítulo 3, la microscopía bimodal y en concreto el canal de fase del segundo modo ϕ_2 proporciona una mejora en la visualización tanto de redes bidimensionales como de biomoléculas en aire y en líquidos. Por esta razón hemos decidido aplicar la microscopía de fuerzas bimodal a la medida de fuerzas más pequeñas y difíciles de detectar. Hemos observado un

aumento de la resolución lateral y de la sensibilidad al detectar las capas que da lugar a información adicional que facilita la interpretación de las imágenes registradas.

6.5.1. Comparación de la resolución lateral en los canales de A_1 y ϕ_2 .

Se ha estudiado cómo varía la resolución lateral de las imágenes correspondientes a los cortes en el plano xy a medida que nos acercamos a la muestra. Las figuras 6.14c-d muestran perfiles en el plano xz en los canales de A_1 y ϕ_2 respectivamente. En las correspondientes curvas de fuerza promediadas (figuras 6.14e-f) se señalan con números las posiciones en el eje z señaladas por las líneas punteadas rojas en 6.14c-d. En las imágenes en el plano xy tomadas más cerca de la superficie de la muestra (figuras 6.14g,j) se observa una estructura hexagonal tanto en la imagen de A_1 como en la de ϕ_2 . Sin embargo, cuando nos situamos en un punto en el eje z más alejado de la superficie, y observamos las correspondientes a las de la primera capa de hidratación (puntos 2 y 3), las imágenes de A_1 y ϕ_2 se diferencian (figuras 6.14h,i,k,l). Únicamente en la imagen de ϕ_2 es posible observar el ordenamiento lateral de las moléculas de agua en las capas de hidratación producida por el ordenamiento lateral de los átomos en la mica (figuras 6.14k,l). Sin embargo, la imagen de A_1 muestra el promedio de este ordenamiento (figuras 6.14h,i).

El hecho de que el canal de ϕ_2 pueda resolver la red hexagonal en la primera capa de hidratación y A_1 no pueda, también está relacionado con la relación señal/ruido de los respectivos canales. En este caso, la relación señal/ruido en el canal de ϕ_2 ($\Delta\phi_2 \approx 0.2^\circ$ y $\Delta B_2 = 2$ kHz) es de alrededor de 20 veces mayor que en el canal de A_1 ($\Delta A_1 \approx 10$ pm y $\Delta B_1 = 0.5$ kHz).

6.5.2. Comportamiento al disminuir el cociente de amplitudes A_{01}/A_{02} .

El comportamiento de las imágenes en ϕ_2 de las capas de hidratación con el cociente de amplitudes es similar al que tenían las imágenes bimodales en microscopía de fuerzas en modulación de amplitud en líquidos. En la figura 6.15 se muestra el comportamiento a medida que el cociente de amplitudes decrece desde 466 hasta 33. En ellas se observa una disminución del ruido en el canal de ϕ_2 provocada principalmente por el aumento de A_2 .

Esto coincide con lo visto en el capítulo 3, donde se observaba que la microscopía de fuerzas bimodal en líquidos no seguía la tendencia que presentaba en aire, obteniendo mejores resultados con un cociente de amplitudes alto porque esto mejoraba la relación señal/ruido de la imagen en los canales del segundo modo.

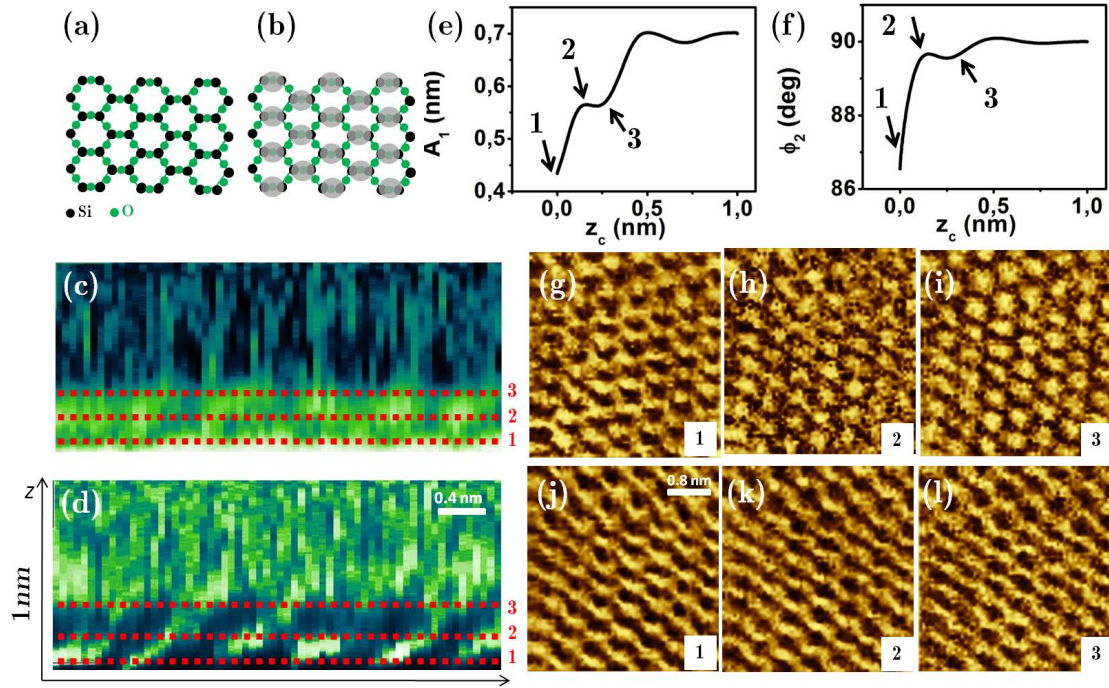


Figura 6.14: (a) Esquema de la red hexagonal de átomos de Si y O en la mica y (b) lo que se observaría si al medir se promediaran las posiciones correspondientes a los átomos de silicio. (c)-(d) Perfiles en el plano xz en el canal de A_1 y ϕ_2 . (e)-(f) Curvas de fuerza promediadas en la imagen de A_1 y ϕ_2 . Cortes en el plano xy de (g)-(i) A_1 y (j)-(l) ϕ_2 para los valores de z indicados por líneas punteadas rojas 1-3 en (c)-(d) y flechas 1-3 en (e)-(f).

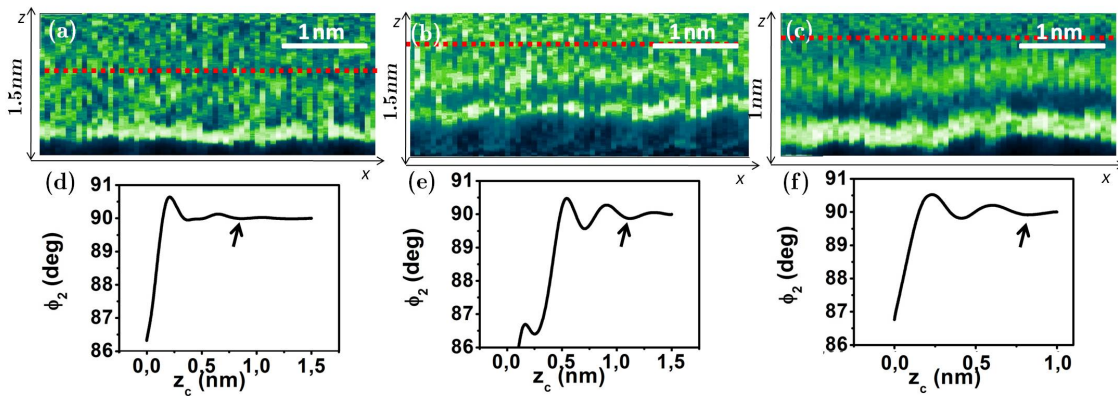


Figura 6.15: Perfil en el plano xz del comportamiento de ϕ_2 para valores de A_{01}/A_{02} de (a) 466, (b) 77 y (c) 33 y (d)-(f) correspondientes curvas de fuerza promediadas. Las líneas punteadas rojas de las figuras (a)-(c) corresponden a la capa de hidratación señalada por flechas en (d)-(f).

6.5.3. Comportamiento de las capas de hidratación al incrementar A_{02}

Al estudiar el comportamiento de las capas de hidratación con la amplitud del segundo modo A_{02} a una amplitud del primer modo fija ($A_{01} = 70$ pm) se observan dos características bien diferenciadas. La figura 6.16 muestra lo que ocurre cuando $\langle A_1 \rangle$ es alta y lo que vemos principalmente son las capas de hidratación. En ella se presenta el perfil en el plano xz de las capas de hidratación para una amplitud del segundo modo A_{02} de 2.64, 3.77, 5.58, 8.23 y 9.7 pm respectivamente en los canales de ϕ_2 (figuras 6.16a-e) y A_1 (figuras 6.16f-j). Un pequeño aumento en A_2 resulta en un aumento en la calidad de la imagen de las capas debido a la disminución del ruido en ϕ_2 . Sin embargo, cuando A_{02} es mayor de 8 pm y el cociente de amplitudes es entonces menor que 9 (figuras 6.16d-e) se observa como la capa de hidratación señalada por la línea punteada roja comienza a difuminarse hasta casi desaparecer. A medida que el cociente de amplitudes continúa aumentando la amplitud de la oscilación total también aumenta. Esto puede dar lugar a un promedio en la medida de las capas de hidratación, haciendo incluso que una capa llegue a dejar de ser detectada.

La figura 6.17 muestra lo que ocurre cuando $\langle A_1 \rangle$ disminuye. Esto implica que la distancia media entre la punta y la muestra también es menor y que la imagen bimodal proporciona información adicional sobre lo que ocurre en el sustrato. Por una parte, si comparamos las figuras 6.17a y 6.17d sigue estando presente el hecho mencionado antes sobre la difuminación de la capa de hidratación (correspondiente a la línea punteada roja) cuando A_{02} pasa de 3 a 10 pm. Si en lugar de ello enfocamos la atención a las capas inferiores (señaladas por la línea punteada gris en 6.16a-d) se observa un desdoblamiento en la superficie. Basándonos en la figura 6.17a que corresponde al perfil xz en ϕ_2 para $A_{02} = 3$ pm se podría pensar que la superficie está delimitada por la línea punteada amarilla. La superficie en el perfil de ϕ_2 (véase figura 6.17a) parece estar dividida en una parte más oscura cuya periodicidad es como la del centro de los hexágonos en la red de mica (0.52 nm) y en otra parte también oscura aunque más clara en la que no existe esta corrugación. A medida que A_{02} aumenta aparece en la imagen de ϕ_2 una capa blanca entre ambas zonas oscuras que toma la corrugación de la primera capa de la superficie. Estas imágenes coinciden con las que Yamada y colaboradores observan en [221] y que indican la existencia de moléculas de agua en el centro de los hexágonos. Parece que lo que consideramos como superficie en 6.17a pudiera ser en realidad la superficie con moléculas de agua dentro de los hexágonos que forman los átomos de silicio de la mica; al incrementar A_2 y con ello la energía almacenada en la micropalanca, estas moléculas podrían ser extraídas lejos de la superficie y por tanto detectadas (véase línea punteada amarilla en 6.17d).

No podemos demostrar que la superficie está en el lugar que nuestra hipótesis estima (líneas amarillas en las figuras 6.17a,d). Sin embargo, es posible recurrir a los cortes en el plano xy correspondientes a cada capa de hidratación de la ima-

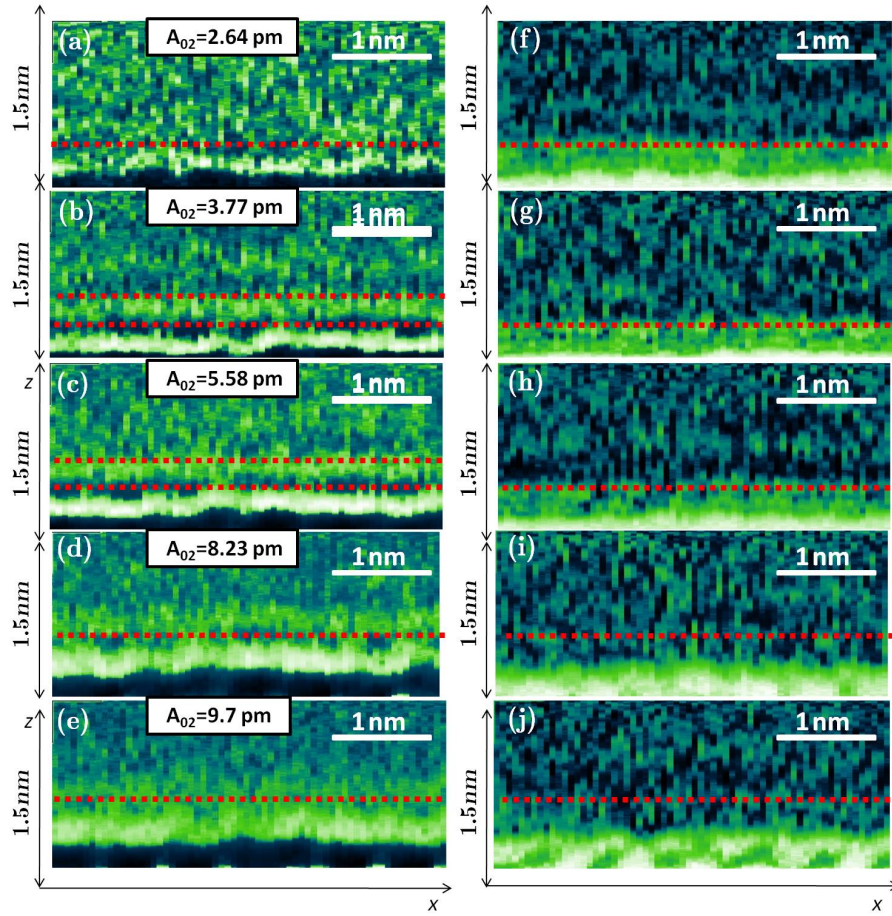


Figura 6.16: Perfil en el plano xz en los canales de (a)-(e) ϕ_2 y (f)-(j) A_1 para valores crecientes de A_{02} . Las líneas punteadas rojas corresponden a la misma capa de hidratación en las imágenes (a)-(e)

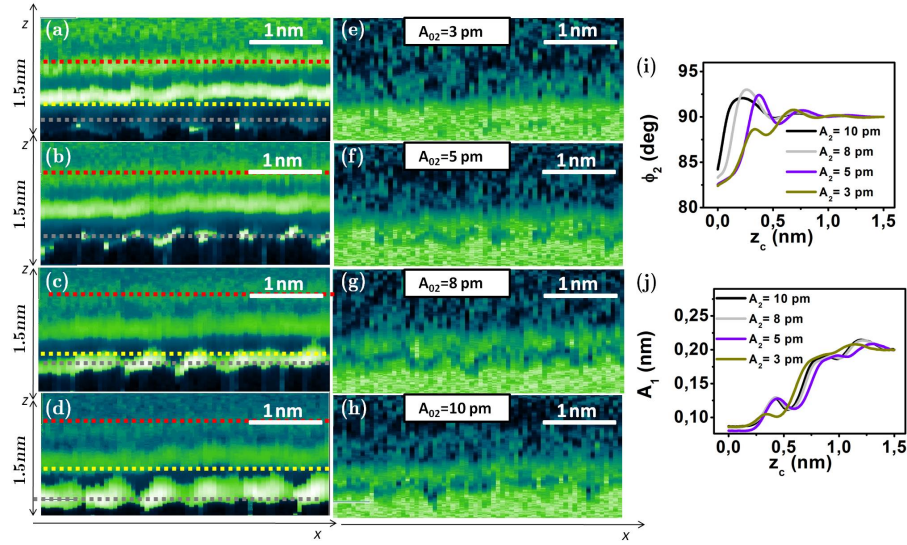


Figura 6.17: Perfil en el plano xz en los canales de (a)-(d) ϕ_2 y (e)-(h) A_1 para valores crecientes de A_{02} . Correspondientes curvas promediadas de (i) ϕ_2 y (j) A_1 frente a z_c .

gen de la figura 6.17b y estudiar las diferencias entre ellos. En la figura 6.18a-e se presentan cortes en el plano xy correspondientes a los valores en z señalados por líneas punteadas en la figura 6.18f y por flechas en la figura 6.18g. En las figuras 6.18a-c se observa una distorsión en la red de mica, que no sigue el patrón de una red hexagonal. Sin embargo, en las figuras 6.18d-e se observa la red hexagonal de átomos de silicio sin distorsionar. Esto coincide con la hipótesis formulada en base a la figura 6.17 en relación al lugar donde se encuentra la superficie. Esto podría indicar la existencia de una deformación de la superficie de la mica cuando la punta interactúa fuertemente con la superficie, causando que la red hexagonal también estuviera distorsionada en la imagen (véase esquema en las figuras 6.18h-j). Por tanto, las imágenes correspondientes a los cortes en los planos xy parecen ser una herramienta útil para determinar el lugar donde se encuentra la superficie.

Por otra parte, el hecho de que la mica sea hidrofílica y conmensurable con el tamaño de la molécula de agua proporciona un mecanismo de ordenamiento de las moléculas de agua en la primera capa de hidratación.

En la figura 6.19 se observan los perfiles promediados a lo largo de los ejes x y z del experimento presentado en la figura 6.18. Ambos muestran una periodicidad, pero la periodicidad en el eje z está en torno a los 0.4 nm y la periodicidad en el eje y está entre los 0.52 nm y los 0.7 nm. Esto muestra que no existe correlación entre ambas estructuraciones de las moléculas. Mientras que el perfil en el eje z correspondiente a la figura es un reflejo de la existencia de moléculas de agua confinadas entre la punta y la muestra, el perfil en el eje x sobre la primera capa de hidratación (véase perfil correspondiente a 4 de la figura 6.19b) tiene una periodicidad consis-

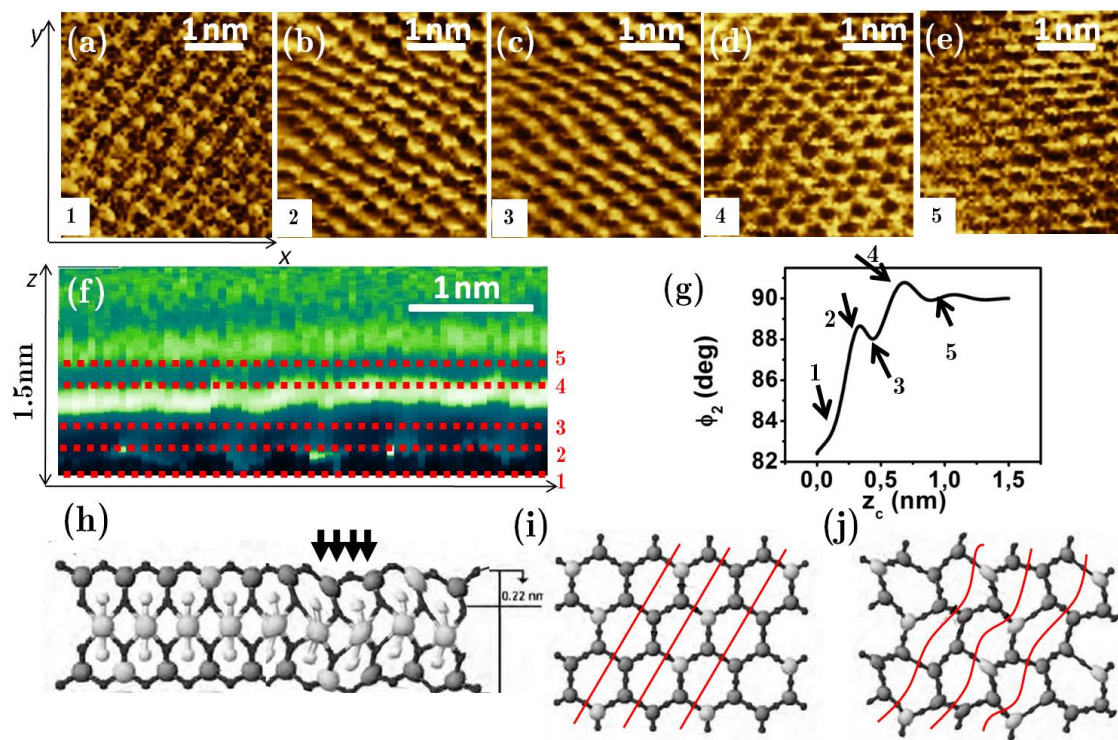


Figura 6.18: (a)-(e) Cortes en el plano xy en el canal de ϕ_2 para los valores de z indicados por líneas punteadas rojas y flechas en (f) y (g). (f) Perfil en el plano xz en el canal de ϕ_2 y (g) Comportamiento de ϕ_2 frente a z_c promediado. Esquema de la mica en la dirección (h) [001] y (i)-(j) [100]. Describe el efecto de deformación de la muestra en ambos planos cuando la punta interactúa fuertemente. Esta deformación puede dar lugar a distorsiones en la red hexagonal medida, como parece que ocurre en las figuras 6.18.

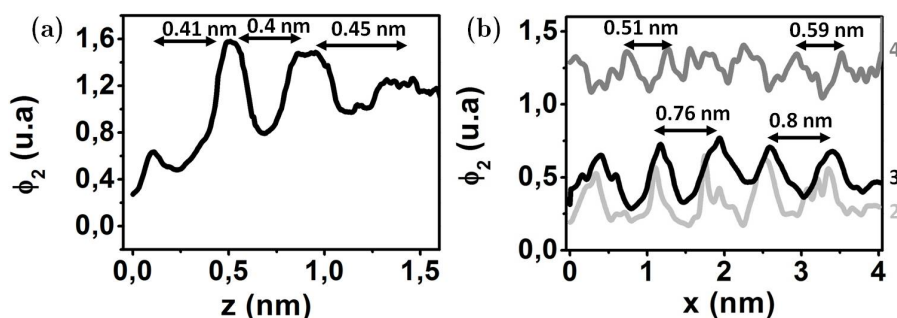


Figura 6.19: Perfiles (a) a lo largo del eje vertical z y (b) del eje horizontal x correspondientes a las líneas punteadas 2, 3 y 4 de la figura 6.18f. Se observa que la periodicidad en z , que refleja la existencia de las capas de hidratación, es diferente de la periodicidad en x , que corresponde a la que siguen los átomos en la mica.

tente con la separación de los átomos en la mica (0.52 nm). Sin embargo, en el perfil en el eje x correspondiente a la superficie la periodicidad es algo mayor (perfiles correspondiente a 2 y 3 de la figura 6.19b), lo que pudiera ser fruto del promedio de fuerzas al haber aumentado el radio de contacto.

6.5.4. Comportamiento viscoelástico

Cuando un fluido es confinado entre dos superficies, puede tener lugar, bajo determinadas circunstancias, un comportamiento viscoelástico del mismo, que consiste en la coexistencia de un comportamiento elástico con un aumento de la viscosidad efectiva. Existe cierta controversia sobre el comportamiento viscoelástico del agua confinada [215] sobre mica. Además de las diferencias entre el agua y los solventes orgánicos no polares, la superficie de la mica introduce dificultades adicionales a la hora de modelarla debido al intercambio de iones que ocurre en disolución. Algunos autores afirman que el agua confinada se comporta como un líquido [214, 225], mientras otros afirman que su comportamiento es más parecido al de un sólido [11, 226, 227, 228]. Recientemente, Hoffmann y colaboradores han propuesto una solución a estos resultados contradictorios estudiando el comportamiento viscoelástico del agua confinada dependiendo de la velocidad de aproximación [213].

La observación experimental de un ordenamiento lateral de las moléculas de agua en la primera capa de hidratación cuya periodicidad es la misma que la de los átomos de silicio en la red de mica tiene implicaciones en el problema del comportamiento viscoelástico del agua confinada. Incluso autores que no observan la estructura de hielo de forma dinámica [214, 225] coinciden en afirmar la posibilidad de este ordenamiento, que es también predicho por las simulaciones de dinámica molecular [226, 229]. Nuestras medidas del ordenamiento lateral presentadas en la sección anterior se unen a estas afirmaciones, indicando un comportamiento elástico del agua confinada.

6.5.5. Dependencia de las capas de hidratación con la forma de la punta

Como se mencionó en la introducción, uno de los inconvenientes de la medida de capas de hidratación mediante microscopía de fuerzas es su alto nivel de dependencia en la punta utilizada. Para estudiar si lo que se observa es el ordenamiento de las moléculas sobre el sustrato estudiado o el que se está induciendo al aproximar la punta sería necesario repetir los experimentos con puntas de distintos tamaños, formas y materiales. Lo que se presenta en esta sección se reduce a señalar la dependencia de las capas de hidratación en la forma de la punta. En la figura 6.20 se muestran perfiles en el plano xz tomados con la misma punta correspondientes a imágenes sucesivas en el tiempo. Se observa que al comenzar la adquisición de la secuencia de imágenes (figura 6.20a) las capas de hidratación tienen forma oblicua, y a medida que el tiempo transcurre toman una forma mucho más uniforme (figura

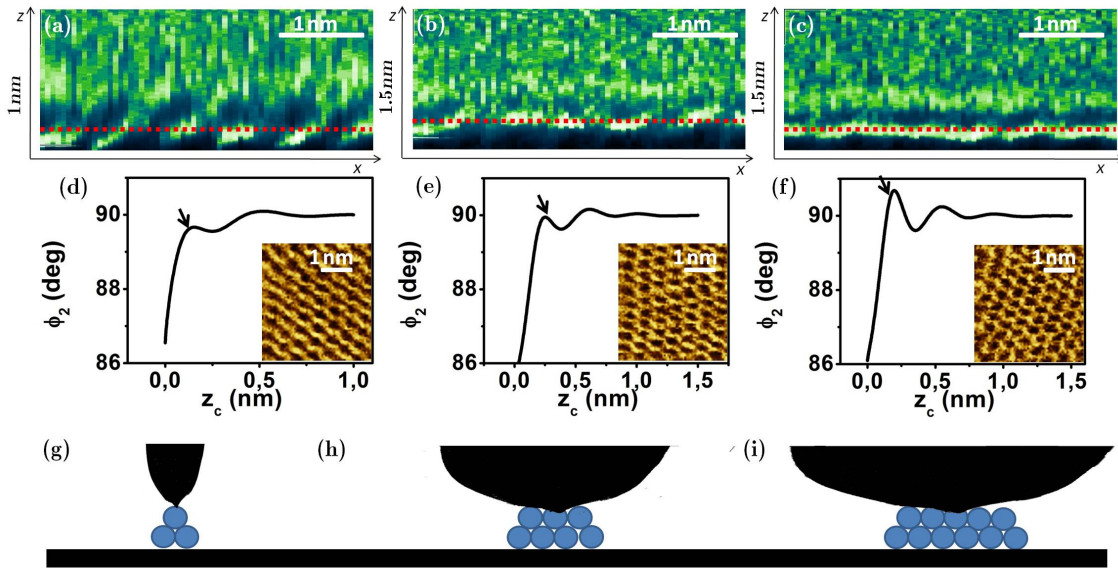


Figura 6.20: (a)-(c) Perfiles en el plano xz en el canal de ϕ_2 correspondientes a imágenes sucesivas en el tiempo y (d)-(f) correspondientes curvas de fuerza promediadas y cortes en el plano xy. (g)-(i) Esquema del proceso de aplanamiento de la punta con el tiempo y de su efecto en las fuerzas de solvatación.

6.20b-c) para los mismos valores de los parámetros A_{01}, A_{02} utilizados. Esto podría indicar^o que la punta ha cambiado, probablemente se ha hecho más plana a través de la indentación sucesiva en la muestra y por ello las capas de hidratación al final de la adquisición de la secuencia de imágenes se observan con mayor claridad que al principio. Los cortes en el plano xy de la imagen tridimensional (véase figuras 6.20d-f) no inducen a pensar en una posible contaminación de la punta, puesto que la resolución lateral no empeora. La incongruencia entre la afirmación de que la punta se aplanan a medida que pasa el tiempo mientras que la resolución lateral no empeora, es debido a que la resolución lateral viene en la mayor parte de los casos dada por protusiones en la punta; de otra forma sería imposible ver la periodicidad de la mica (0.52 nm) con una punta como la utilizada cuyo radio nominal es de 10 nm. En las figuras 6.20g-i) se observa un esquema de cómo el proceso de aplanamiento de la punta mejoraría el confinamiento de las moléculas de líquido, haciendo más estable la medida de las capas de hidratación.

6.6. Resultados experimentales sobre GroEL

En esta sección se presentan los resultados experimentales sobre la red de GroEL. En el capítulo 3) se mostraron imágenes de esta red mediante microscopia de fuerzas bimodal en modulación en amplitud. También se mencionó la fragilidad de la red que las moléculas de GroEL forman al autoensamblarse y se enfatizó la

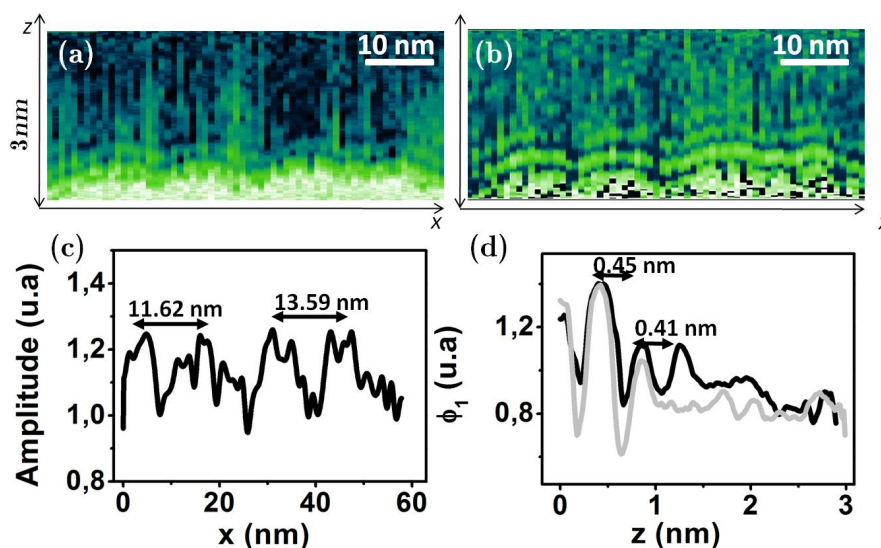


Figura 6.21: Perfil en el plano xz en los canales de (a) amplitud y (b) fase del primer modo sobre GroEL. Perfiles a lo largo del eje horizontal x y vertical z que no muestran correlación entre el ordenamiento vertical y horizontal de las moléculas de agua.

necesidad del uso de amplitudes libres pequeñas y amplitudes de trabajo altas para su medida. Es preciso recordar que esas medidas fueron realizadas con micropalanca de constante de fuerzas $k \approx 0.8$ N/m. Estas micropalancas son las más convenientes para tomar imágenes de la red de GroEL debido a que su baja constante de fuerzas resulta en fuerzas de interacción menores.

Sin embargo, no es posible medir con ellas las capas de hidratación puesto que cuando intentamos modular en z a medida que nos desplazamos lateralmente las micropalancas se quedan pegadas en la muestra. Por esta razón, la mayor dificultad de estos experimentos reside en encontrar micropalancas de una constante de fuerzas tal que permita la adquisición de imágenes de las capas de hidratación sin dañar la muestra. Las puntas más blandas ($k \approx 10$ N/m) no dañan la muestra y proporcionan una buena imagen de topografía, pero es difícil ver con ellas las capas de hidratación. Con las más duras ($k \approx 40$ N/m) siempre es posible observar las capas de hidratación. Sin embargo, no suelen proporcionar imágenes en los cortes correspondientes al plano xy en el que se aprecie la topografía de la muestra como ocurría con la mica. Además, si intentamos tomar una imagen de microscopía de fuerzas en modulación en amplitud utilizando este tipo de puntas, sólo lo podemos hacer con una amplitud de trabajo muy alta y una velocidad de escaneo rápida. Es muy probable que esto sea debido a que estamos aplastando la muestra, si bien las razones últimas no han sido determinadas.

En cuanto a la medida de capas de hidratación, se han encontrado fundamentalmente dos diferencias respecto a lo observado en mica. Para medir las capas de

hidratación sobre la red de GroEL es necesario interaccionar algo más fuertemente con la superficie, esto es, utilizar una amplitud media de trabajo $\langle A_1 \rangle$, de forma que se indenta más en la muestra. Si no lo hacemos, únicamente se ven fluctuaciones que no permiten intuir ni dónde están ni cuántas son las capas de hidratación. Si disminuimos $\langle A_1 \rangle$ de tal forma que la punta interacciona más fuertemente empezamos a ver el ordenamiento en el eje vertical de las moléculas del líquido. En las figuras 6.21a-b se observan los perfiles en el eje xz de las capas de hidratación sobre la red de GroEL en los canales de A_1 y ϕ_1 . No es posible obtener imágenes simultáneas en el plano yz en el que se observe el anillo de la molécula de GroEL. Debido a la baja $\langle A_1 \rangle$ y consecuente fuerza aplicada alta, y a la fragilidad de la red de GroEL es muy probable que estemos aplastando las moléculas. En las figuras 6.21c-d se observan perfiles a lo largo de las direcciones vertical y horizontal. Ambos perfiles no muestran correlación entre sí, al igual que pasaba en los perfiles correspondientes a la mica. La periodicidad que se observa en el eje vertical está entre 0.4 y 0.45, al igual que ocurría en las imágenes adquiridas sobre la mica. La periodicidad observada en el eje horizontal es de entre 11.5 y 14 nm, cercano al diámetro de la molécula de GroEL. Esto permite afirmar que pese a la ausencia de imágenes en los cortes obtenidos sobre los planos xy de la imagen tridimensional, las capas de hidratación se han medido sobre la red de GroEL.

La segunda característica que aparece y que no había estado presente sobre la mica es la inestabilidad con la que las capas de hidratación son detectadas. Estas inestabilidades están reflejadas en la figura 6.22, que presenta perfiles en el eje xz correspondientes a sucesivos puntos en el eje y. Tienen dos causas fundamentales. La primera es la rugosidad e irregularidad de la muestra estudiada, cuya altura es de 14 nm. Además, a pesar de que las proteínas estén autoensambladas formando una red plana existen tanto defectos como conglomerados que hacen que la muestra también sea irregular. Un ejemplo de esto se muestra en la figura 6.22k, donde las capas de hidratación dejan de ser detectadas por lo que parece ser un cambio brusco en la topografía de la muestra. La segunda son las fluctuaciones térmicas de la red de GroEL que está sobre el sustrato de mica. Estas fluctuaciones se manifiestan en la presencia de líneas verticales a lo largo de toda la medida (figuras 6.22a-l).

Una dificultad adicional en la medida de las capas de hidratación sobre GroEL es que el problema no se puede estudiar el problema de forma continuada. El hecho de que $\langle A_1 \rangle$ haya de ser pequeña facilita una rápida contaminación de la punta con moléculas de GroEL.

6.7. Conclusiones

La microscopía de fuerzas tridimensional (3D-SFM) permite la adquisición de imágenes tridimensionales con una gran velocidad y una alta sensibilidad. En particular, permite la adquisición de imágenes tridimensionales de las capas de hidratación entre una muestra y la punta de la micropalanca. La combinación de la

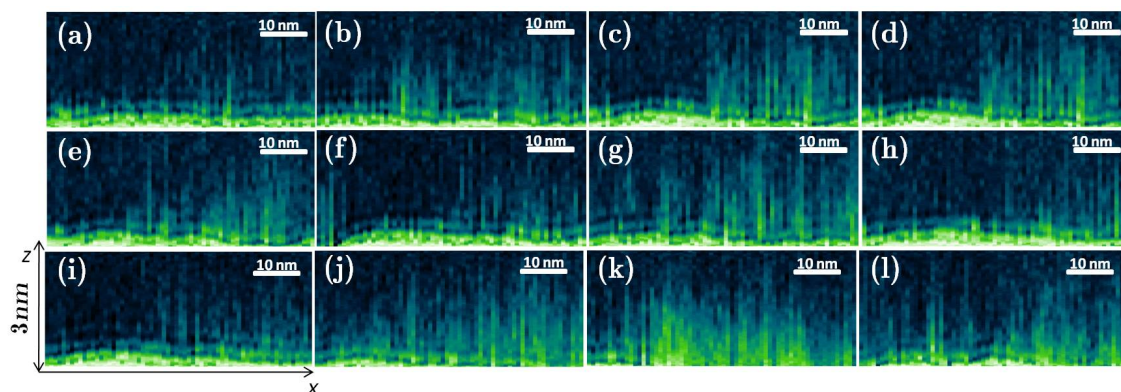


Figura 6.22: Cortes en el plano xz para valores consecutivos en el eje y.

microscopía de fuerzas bimodal con la microscopía de fuerzas tridimensional (3D-SFM) permite obtener un aumento en la sensibilidad en la medida de las capas.

La relación señal/ruido en el canal de fase es más de 500 veces mayor que la que hay en el canal de amplitud. Las imágenes que la microscopía bimodal de fuerzas tridimensional proporciona en el canal de fase del segundo modo muestran un incremento en sensibilidad cuando la amplitud del segundo modo A_2 es comparable a la del primero.

Las imágenes de las capas de hidratación en ϕ_2 muestran un comportamiento cualitativamente distinto del obtenido en el canal de A_1 a medida que A_2 aumenta. Las imágenes de ϕ_2 parecen indicar la presencia de moléculas de agua fuertemente unidas a la superficie. En la superficie, se observa una distorsión de la red de mica provocada por la deformación que la punta ocasiona a medida que interacciona más fuertemente con la superficie.

Las imágenes de ϕ_2 obtenidas muestran periodicidad tanto en el plano vertical como en los horizontales. No existe ninguna correlación entre ambas periodicidades. En el plano vertical, las moléculas de agua se ordenan según el diámetro de las mismas (0.26 nm). El resultado obtenido utilizando la microscopía de fuerzas bimodal tridimensional calculado es algo mayor (0.4-0.45 nm). Entre otros factores, esto podría ser debido a que para el cálculo se ha utilizado la curva de fuerzas promedio, esto es, la que incluye tanto el promedio sobre el centro del hexágono como sobre los extremos. La periodicidad en la dirección horizontal varía según se mida en la superficie (0.8 nm) o en la primera capa de hidratación (0.51 nm).

El hecho de que sea posible resolver el ordenamiento lateral de las moléculas de agua en la primera capa de hidratación con una periodicidad similar a la de los átomos del silicio de la red hexagonal de mica (cuya periodicidad es de 0.52 nm) apunta a un comportamiento elástico del agua confinada que está de acuerdo con la bibliografía. El incremento en periodicidad lateral obtenido en la superficie es posiblemente debido al aumento del radio de contacto y al consecuente promedio de la fuerza medida.

La microscopía de fuerzas tridimensional también proporciona medidas de capas de hidratación sobre muestras de rugosidad alta y cuya longitud típica en el eje horizontal es mayor. En particular, es posible medir de forma tridimensional las capas de hidratación sobre GroEL, cuya altura y diámetro es de aproximadamente 14 nm. La alta fuerza de interacción punta-muestra que la medida de las capas de hidratación sobre esta muestra conlleva y la gran fragilidad que la red de proteínas presenta dificulta la obtención de imágenes tanto en los cortes correspondientes a los planos xy como en los cortes correspondientes a los planos yz y xz.

La periodicidad obtenida sobre la red de GroEL en el plano vertical es similar a la obtenida sobre la mica (0.4-0.45 nm), indicando un ordenamiento vertical de las moléculas de agua debido al confinamiento entre la punta y la muestra. La periodicidad en la dirección horizontal varía entre 11.5 y 14 nm, lo que coincide con el diámetro de la molécula de GroEL. Esto indica que la medida de las capas de hidratación se ha llevado a cabo sobre la red biológica.

Se observan inestabilidades debidas a la rugosidad, irregularidad, y fluctuaciones térmicas de la red de GroEL que, unido a la más que probable contaminación de la punta, dificultan la realización de medidas de forma continuada.

Conclusiones generales

1. El contraste proporcionado por los canales del segundo modo en la microscopía de fuerzas bimodal no depende únicamente de los parámetros relacionados con el segundo modo de oscilación. El hecho de que la amplitud del primer modo sea muy superior a la del segundo modo produce una dependencia de la fuerza de interacción y consecuentemente del contraste bimodal en los parámetros del primer modo. Esto resulta en un aumento del contraste bimodal a medida que A_1 aumenta, A_2 disminuye o Q_1 disminuye.
2. La microscopía de fuerzas bimodal se puede implementar en líquidos conservando las características de incremento de la resolución lateral y del contraste conservativo que proporcionaba en aire. Sin embargo, el rango de valores de los parámetros utilizados, especialmente el cociente entre la amplitud del primer modo y la del segundo cambia ($A_{01} \approx 1 - 5A_{02}$), disminuyendo con respecto a lo observado en aire ($A_{01} \approx 15 - 20A_{02}$).
3. La microscopía de fuerzas bimodal permite la estimación del módulo de Young efectivo de una muestra de forma simultánea a la adquisición de una imagen de topografía. La aplicación experimental del método y los estudios teóricos demuestran que el método es válido para muestras de bajo módulo de Young efectivo ($E^* \approx 10\text{MPa} - 3\text{GPa}$).
4. La microscopía de fuerzas bimodal puede ser combinada con otras técnicas. En particular, si es combinada con la microscopía de fuerzas tridimensional es posible medir fuerzas muy pequeñas como por ejemplo las fuerzas de solvatación, que precisan de alta sensibilidad para ser detectadas.
5. Es posible medir la estructuración de las moléculas de agua entre la punta de la micropalanca y la mica en la dirección vertical y en la dirección horizontal utilizando el canal de fase del segundo modo. En la dirección vertical, las moléculas de agua se ordenan con una periodicidad del tamaño de la molécula de agua debido al confinamiento de las moléculas entre la muestra y la punta. En la dirección horizontal, las moléculas de agua de la primera capa de hidratación siguen el ordenamiento de los átomos de la mica.
6. La estructuración en el plano horizontal de las moléculas de agua en la primera capa de hidratación apunta a un comportamiento elástico del agua confinada.

7. La microscopía de fuerzas tridimensional también hace posible medir las fuerzas de solvatación sobre una red de proteínas de altura considerable, a pesar de la rugosidad, irregularidad y fluctuaciones térmicas de la red.
8. La oscilación de una micropalanca depende del método de excitación utilizado para hacerla oscilar. No existen diferencias significativas en aire entre la excitación magnética y la acústica. Sin embargo, las diferencias en agua son importantes, especialmente a medida que disminuye la constante de fuerzas de la micropalanca ($k < 1 \text{ N/m}$). Las diferencias se pueden describir utilizando el modelo de masa puntual y escribiendo las ecuaciones del movimiento para cada modo de excitación en función del observable correcto (la deflexión).
9. La generación de armónicos superiores es un fenómeno causado por la aparición de fuerzas no lineales. La dependencia de estos armónicos en el medio en el que la micropalanca está inmersa depende de la porción de ciclo donde entre la fuerza no lineal. Si la fuerza entra en un corto periodo de oscilación, se fija una fuerza de excitación constante y se hace oscilar la micropalanca a su frecuencia de resonancia, los armónicos generados A_n no dependen del factor de calidad.
10. Cuando la fuerza de excitación es constante la distorsión armónica de la señal A_n/A_0 sí depende del factor de calidad debido a la dependencia de A_0 en Q . Esto facilita la adquisición de imágenes en armónicos superiores en líquidos. Además, la sensibilidad los armónicos superiores para un cambio en el módulo de Young efectivo de la muestra es también mayor en líquidos.
11. El estudio de la generación de armónicos superiores proporciona una serie de aproximaciones que, combinadas con una aproximación fenomenológica para el comportamiento temporal de la fuerza de interacción, permiten la propuesta de un método para la medida simultánea de topografía y flexibilidad de una imagen utilizando la deflexión y los primeros armónicos superiores.

Lista de Publicaciones

1. **E. T. Herruzo** y R. Garcia. Frequency response of an atomic force microscope in liquid and air: Magnetic versus acoustic excitation. *Applied Physics Letters* (2007).
2. N.F. Martínez, J. R. Lozano, **E. T. Herruzo** y R. Garcia. Bimodal atomic force microscopy imaging of isolated antibodies in air and liquids. *Nanotechnology* (2008).
3. **E. T. Herruzo**, R. Garcia, R. Proksch, I. Revenko y M. G. Heaton. Bimodal Atomic Force Microscopy Imaging of Collagen Fiber Ultrastructure. *Microscopy and Analysis* (2009).
4. C. Dietz, **E. T. Herruzo**, J. R. Lozano, y R. Garcia. Nanomechanical Coupling Enables Detection and Imaging of 5 nm Superparamagnetic Particles in Liquid. *Nanotechnology* (2011).
5. D. Martinez-Martin, **E. T. Herruzo**, C. Dietz, J. Gomez-Herrero y R. Garcia. Non-invasive protein structural flexibility mapping by bimodal dynamic force microscopy. *Physical Review Letters* (2011).
6. **E. T. Herruzo**, H. Asakawa, T. Fukuma y R. Garcia. Imaging hydration layers on biological samples by 3D-bimodal forces microscopy Enviado a la revista *Applied Physics Letters*.
7. **E. T. Herruzo** y R. Garcia. Higer harmonics generation in low quality factor environments. Manuscrito *en preparación*.

Apéndice A

Influencia de la caja acústica en el ruido del microscopio

En este apéndice se compara el ruido electrónico de un microscopio comercial con el ruido electrónico correspondiente a un microscopio en el que se han optimizado la mayor parte de los elementos que lo componen [6]. Además del ruido que puede ser transmitido a través de las vibraciones del edificio donde el microscopio está y que normalmente se aísla mediante mesas de vibración activas o colocando el microscopio en una superficie sujeta por cuerdas elásticas, existe ruido que puede ser transmitido a través de ondas acústicas. Este ruido es más significativo cuando el microscopio opera en líquidos que cuando opera en aire, debido a su mayor densidad. Para evitarlo, los microscopios que operan en líquidos suelen estar aislados por una campana o caja de aislamiento acústico. En este apéndice también se compara la influencia de esta caja de aislamiento acústico en el ruido.

Espectro de ruido térmico

El ruido de nuestro montaje experimental se puede estimar calculando el espectro de ruido térmico. En la figura 23a se observa la densidad de ruido frente a la frecuencia experimental de un microscopio en el que, entre otras cosas, se ha disminuido el camino óptico que el haz láser recorre, se ha modulado el láser en radio-frecuencia y se han minimizado el ruido shot y el ruido Johnson-Nyquist del fotodetector hasta obtener una densidad de ruido de $40 \text{ fm/Hz}^{1/2}$ en líquidos [6]. Esta densidad de ruido se puede calcular comparando el espectro de ruido térmico experimental con el espectro teórico de una micropalanca que oscila debido a ruido térmico, que viene dado por [181]:

$$n_{zB} = \sqrt{\left(\frac{2k_B T}{\pi f_0 k Q} \frac{1}{(1 - (\frac{f}{f_0})^2)^2 + (\frac{f}{f_0 Q})^2} \right)} \quad (\text{A.1})$$

donde k_B es la constante de Boltzmann, T la temperatura, f_0 , Q y k la frecuencia de resonancia, factor de calidad y constante de fuerzas de la micropalanca.

En el origen, la expresión teórica de la ecuación .7 da un valor muy pequeño para n_{zB} , valor que no se observa experimentalmente. Esta diferencia se puede atribuir a la existencia de ruido externo en el sistema[6].

La micropalanca utilizada para el experimento que se presenta en la figura 23b tiene una frecuencia de resonancia $f_0 \approx 32$ kHz en líquidos, $k \approx 3$ N/m y $Q \approx 8.5$. Introduciendo estos valores en la ecuación .7 se obtiene un ruido térmico de 56.6 fm/Hz^{1/2} en el origen. En nuestro caso, el ruido en el origen es de 297 fm/Hz^{1/2} para el experimento realizado sin caja de aislamiento acústico, mientras que el correspondiente al experimento realizado con caja de aislamiento acústico es de 250 fm/Hz^{1/2}. Se observa que la caja es capaz de aislar aproximadamente un 17 % del ruido. También se observa que ambos valores son muy superiores al ruido del microscopio optimizado por el grupo de Fukuma [6].

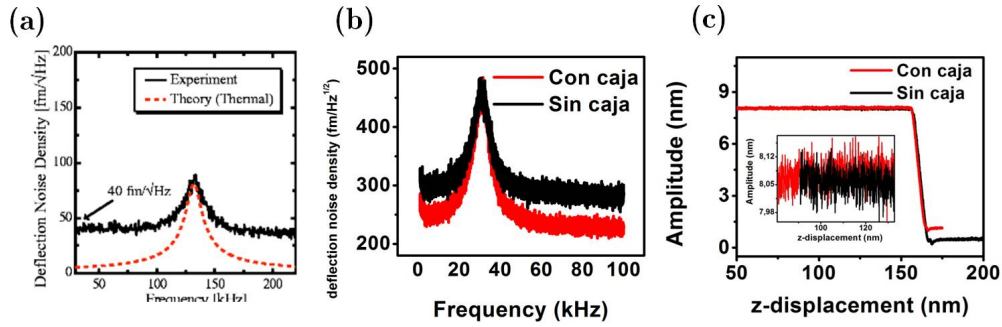


Figura A.1: (a) Espectro de ruido térmico en agua tal y como aparece en [6], (b) espectro de ruido térmico experimental con y sin caja de aislamiento acústico en líquidos y (c) curva amplitud-distancia con y sin caja de aislamiento acústico en líquidos.

Curvas de amplitud-distancia en modo dinámico

Cuando se toma una imagen de una muestra, el lock-in amplifier filtra una gran cantidad de ruido. Esta cantidad está determinada por el ancho de banda del lock-in: cuanto más pequeño sea más ruido se filtra. El ancho de banda tiene un límite inferior a fijar, ya que si se disminuye mucho filtrará el ruido, pero también la señal que se quiere medir. Se puede entonces calcular el ruido que se tendría en la adquisición de una imagen a partir de las curvas amplitud A frente a distancia media punta-muestra z_c en modo dinámico. En la figura 23c se presenta la curva amplitud-distancia tomada a una frecuencia de rastreo de 2 Hz y con 512 puntos, valores aproximados de los parámetros utilizados en la adquisición de imágenes. En la figura 23c se puede observar que en este caso el ruido es de 0.14 nm tanto para el microscopio aislado acústicamente como para el que no lo está. Se puede comparar este valor con el que se obtiene sustituyendo este ancho de banda para el ruido hallado en el apartado anterior, que viene dado por:

$$n_{zB} \cdot \Delta B = 250\text{fm}/\text{Hz}^{1/2} \sqrt{2\text{Hz}} = 0.35\text{pm} \quad (\text{A.2})$$

El ruido obtenido utilizando esta relación es de 11.18 pm, mucho menor del que realmente se mide en una curva de fuerzas (140 pm). Esto podría ser debido a que el ruido al excitar la micropalanca a través del piezoeléctrico y del escáner en z contribuyen significativamente al ruido electrónico.

Apéndice B

Reconstrucción de la fuerza por el método de Sader-Katan

En este apéndice se detallan las fórmulas relevantes para reconstruir la fuerza de interacción mediante el método de Sader-Katan [230], así como la validez de dicho método cuando la señal no es armónica y la distancia mínima no se estima correctamente.

El método fue desarrollado por Katan en el año 2009, quién adaptó el método de reconstrucción de la fuerza que Sader había desarrollado unos años antes [178, 179] para FM-AFM a AM-AFM [230]. El método de reconstrucción de la fuerza de Sader para FM-AFM consiste en la inversión de las ecuaciones del virial y de la energía disipada para FM-AFM para así obtener una fórmula que relaciona la fuerza de interacción y la disipación:

$$F_{ts}(d) = 2k \int_d^\infty \left(\left(1 + \frac{A^{1/2}}{8\sqrt{\pi(u-d)}} \right) \Omega_{FM}(u) - \frac{A^{3/2}}{2\sqrt{(u-d)}} \frac{d\Omega_{FM}(u)}{du} \right) du \quad (\text{B.1})$$

$$\gamma_{ts}(d) = -\gamma_c \frac{\partial}{\partial d} \int_d^\infty \left(\left(1 + \frac{A^{1/2}}{8\sqrt{\pi(u-d)}} \right) \Theta_{FM}(u) - \frac{A^{3/2}}{2\sqrt{(u-d)}} \frac{d\Theta_{FM}(u)}{du} \right) du \quad (\text{B.2})$$

donde $\Omega_{FM}(d)$ y $\Theta_{FM}(d)$ se obtienen a partir de los observables en FM-AFM cambio en la frecuencia de resonancia $\Delta\omega$ y cambio en la fuerza de excitación ΔF_0 necesario para mantener la amplitud A constante:

$$\Omega_{FM}(d) = \frac{\Delta\omega}{\omega} \quad (\text{B.3})$$

$$\Theta_{FM}(d) = \frac{\Delta F_0}{F_0} - \frac{\Delta\omega}{\omega} \quad (\text{B.4})$$

$$(\text{B.5})$$

k , ω_0 , F_0 y Q son la constante de fuerzas, la fuerza de excitación, la frecuencia de resonancia y el factor de calidad de la micropalanca. El factor $\gamma_c = \frac{k}{Q\omega_0}$ y A la amplitud de oscilación (que es constante durante la medida).

Es preciso calcular el comportamiento de las funciones $\Omega_{FM}(d)$ y $\Theta_{FM}(d)$ en la distancia. En las curvas de fuerza experimentales se registra el comportamiento de estas magnitudes frente a la distancia media z_c . Sin embargo, es necesario disponer del comportamiento de estas magnitudes frente a la distancia mínima, por lo que es preciso transformar los observables a través de la expresión:

$$d_{\min} = z_c - A \quad (\text{B.6})$$

Katan procede transformando los observables típicos de FM-AFM (cambio en la frecuencia de resonancia y disipación) a los observables típicos de AM-AFM (amplitud y fase de la oscilación). De esta forma, la expresión que relaciona los observables de AM-AFM con la fuerza de interacción y la disipación viene dada por:

$$F_{ts}(d) = 2k \int_d^\infty \left(\left(1 + \frac{A(u)^{1/2}}{8\sqrt{\pi(u-d)}} \right) \Omega_{AM}(u) - \frac{A(u)^{3/2}}{2\sqrt{(u-d)}} \frac{d\Omega_{AM}(u)}{du} \right) du \quad (\text{B.7})$$

$$\gamma_{ts}(d) = -\gamma \frac{\partial}{\partial d} \int_d^\infty \left(\left(1 + \frac{A(u)^{1/2}}{8\sqrt{\pi(u-d)}} \right) \Theta_{AM}(u) - \frac{A(u)^{3/2}}{2\sqrt{(u-d)}} \frac{d\Theta_{AM}(u)}{du} \right) du \quad (\text{B.8})$$

donde $\Omega_{AM}(d)$, $\Theta_{AM}(d)$, $\frac{d\Omega_{AM}(u)}{du}$ y $\frac{d\Theta_{AM}(u)}{du}$ cumplen:

$$\Omega_{AM}(d) = \frac{w_d}{w} \left(1 + \frac{A_d}{A(d)} \cos(\phi(d)) \right)^{1/2} - 1 \quad (\text{B.9})$$

$$\Theta_{AM}(d) = -\Omega_{AM}(d) \left(\frac{QA_d w_d}{A(d)\omega_0} \sin(\phi(d)) \right) \quad (\text{B.10})$$

$$A_d = \frac{A_0}{\omega} \sqrt{(\omega_0^2 - \omega^2)^2 + \left(\frac{\omega\omega_0}{Q} \right)^2} \quad (\text{B.11})$$

Las derivadas $\frac{d\Omega_{AM}(u)}{du}$ y $\frac{d\Theta_{AM}(u)}{du}$ se pueden calcular a partir de las derivadas $\frac{dA(u)}{du}$ y $\frac{d\phi(u)}{du}$ de los observables experimentales A y ϕ :

$$\frac{d\Omega_{AM}(u)}{du} = -\frac{w_d A_d}{2\omega_0 A(u)} \frac{\left(\frac{\cos(\phi(u))}{A(u)} \frac{dA(u)}{du} + \sin(\phi(u)) \frac{d\phi(u)}{du} \right)}{\sqrt{1 + \frac{A_d}{A(u)} \cos(\phi(u))}} \quad (\text{B.12})$$

$$\frac{d\Theta_{AM}(u)}{du} = \frac{\Theta_{AM}(u)}{\Omega_{AM}(u)} \frac{d\Omega_{AM}(u)}{du} + \Omega_{AM}(u) \frac{QA_d w_d}{\omega_0 A(u)} \left(\frac{\sin(\phi(u))}{A(u)} \frac{dA(u)}{du} - \cos(\phi(u)) \frac{d\phi(u)}{du} \right) \quad (\text{B.13})$$

Igual que en el método de reconstrucción de Sader, el método de Sader precisa del conocimiento de las curvas de A y ϕ frente a d , por lo que es necesario transformar las curvas de fuerza experimentales que registran el comportamiento frente a z_c en curvas de A y ϕ frente a d_{\min} y así reconstruir la fuerza de interacción F_{ts} y la disipación γ_{ts} .

Implementación del método en AM-AFM

El método de Sader para FM-AFM asumía una amplitud de oscilación constante A y acotaba el error formal del método a un 10 %. Sin embargo, las propiedades de la transformada de Laplace usadas para invertir las ecuaciones no son aplicable si la amplitud $A(d)$ no es constante. Esto es lo que ocurre para el método de Sader-Katan aplicado a AM-AFM. Por tanto, el error ha de ser estimado en base a las simulaciones numéricas. Se han realizado simulaciones para una micropalanca de $Q = 200$, $f_0 = 103.784$ kHz y $k = 4$ N/m utilizando el modelo DMT (véase ecuación 4.3). Se ha considerado únicamente el régimen atractivo ($E^* = 0$) para dos constantes de Hamaker de la fuerza de Van der Waals diferentes. En la figura 24 se presenta una comparación entre la fuerza real simulada y la fuerza reconstruida para ambas constantes de Hamaker. Se observa la validez del método de reconstrucción en ambos casos.

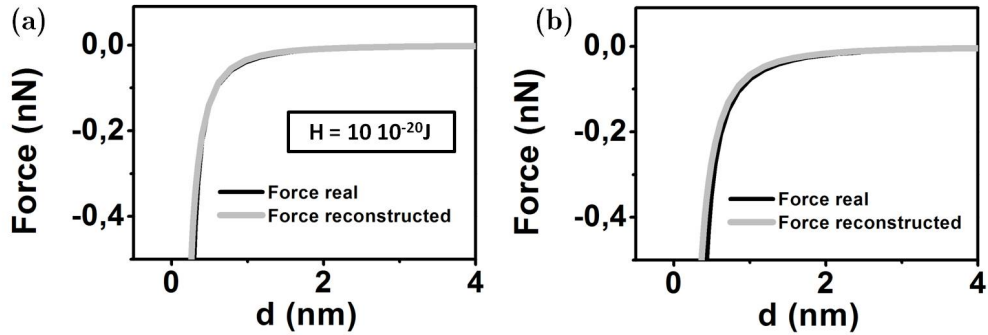


Figura B.1: Comparación entre la fuerza real y la fuerza reconstruida para una micropalanca de $Q = 200$, $f_0 = 103.784$ kHz y $k = 4$ N/m para una constante de Hamaker de (a) $H = 10 \cdot 10^{-20}$ J y (b) $H = 20 \cdot 10^{-20}$ J.

Dependencia con d_{\min}

Como vimos en el capítulo 5, cuando la micropalanca oscila en un medio de bajo factor de calidad se generan armónicos superiores de la frecuencia de excitación y la señal deja de ser armónica. Cabe preguntarse entonces si el método de reconstrucción de la fuerza de Sader-Katan siendo válido. En la figura 25 se observa el comportamiento de la fuerza reconstruida dependiendo del error en la estimación

de la distancia mínima para dos micropalanca de constantes de fuerza distintas. En el caso de la micropalanca de $k \approx 4 \text{ N/m}$ no se observan diferencias entre las reconstrucciones de la fuerza correspondientes a estimar la distancia mínima a partir de la suposición de una señal armónica ($d_{\min} = z_c - A_1$) y a partir de una señal con un alto contenido en armónicos (la distancia mínima obtenida en las simulaciones). Sin embargo, la distorsión armónica de la micropalanca de $k \approx 0.43 \text{ N/m}$, más blanda, es muy superior (véase el capítulo 5). Esto implica que en este caso determinar la distancia mínima d_{\min} sin incluir los armónicos superiores lleva consigo un gran error. Para minimizar dicho error es necesario incluir la contribución tanto de la deflexión como de armónicos superiores de la frecuencia de oscilación. Si se utiliza la d_{\min} simulada, la fuerza reconstruida coincide con la fuerza simulada, mientras que si se utiliza la d_{\min} calculada incluyendo sólo z_c y A_1 , el resultado se aleja. La constante de fuerzas efectiva viene dado por la pendiente de las curvas reconstruidas. Por esta razón, aunque la magnitud de la fuerza reconstruida no difiera demasiado en ambos casos, el error en el cálculo de la distancia mínima se convierte en un gran error en la estimación de la constante de acoplo de la fuerza (véase figura 25b).

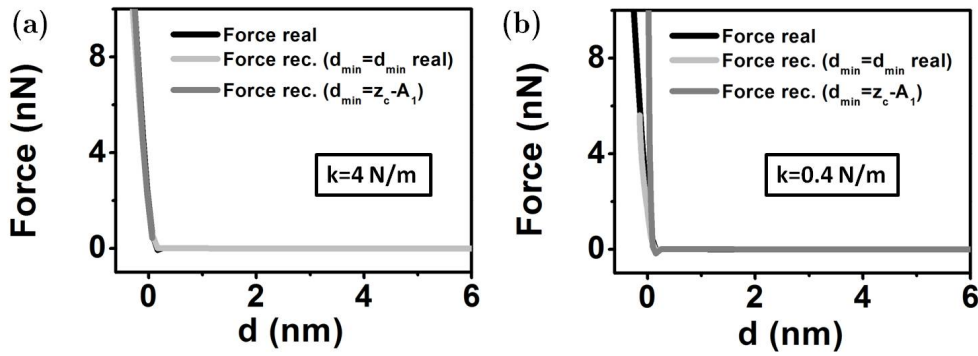


Figura B.2: Comparación entre la fuerza real, la fuerza reconstruida a partir de la d_{\min} real y la fuerza reconstruida a partir de $d_{\min} = z_c - A_1$ para una micropalanca de $Q = 4$, $f_0 = 103.784 \text{ kHz}$ y (a) $k = 4 \text{ N/m}$ y (b) $k = 0.4 \text{ N/m}$.

Bibliografía

- [1] G. Binnig, C. F. Quate, y C. Gerber. Atomic force microscopy. *Physical Review Letters* **56**(9), 930–933 (1986)
- [2] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, y E. Weibel. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters* **40**(2), 178–180 (1982)
- [3] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, y E. Weibel. Surface studies by scanning tunneling microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **49**(1), 57–61 (1982)
- [4] G. Meyer y N. M. Amer. Novel optical approach to atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **53**(12), 1045–1047 (1988)
- [5] G. Meyer y N. M. Amer. Optical-beam-deflection atomic force microscopy: The nacl (001) surface. *Applied Physics Letters* **56**(21), 2100–2101 (1990)
- [6] K. M. K. K. M. K. Y. H. Fukuma, T. Development of low noise cantilever deflection sensor for multienvironment frequency-modulation atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **76**(5) (2005)
- [7] K. Kobayashi, H. Yamada, H. Itoh, T. Horiuchi, y K. Matsushige. Analog frequency modulation detector for dynamic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **72**(12), 4383–4387 (2001)
- [8] B. W. Hoogenboom, P. L. T. M. Frederix, D. Fotiadis, H. J. Hug, y A. Engel. Potential of interferometric cantilever detection and its application for sfm/afm in liquids. *Nanotechnology* **19**(38), 384019 (2008)
- [9] R. Erlandsson, G. M. McClelland, C. M. Mate, y S. Chiang. Atomic force microscopy using optical interferometry. *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films* **6**(2), 266–270 (1988)
- [10] D. Rugar, H. J. Mamin, y P. Guethner. Improved fiber-optic interferometer for atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **55**(25), 2588–2590 (1989)
- [11] S. Jeffery, P. M. Hoffmann, J. B. Pethica, C. Ramanujan, H. O. Özer, y A. Oral. Direct measurement of molecular stiffness and damping in confined water layers. *Phys. Rev. B* **70**(5), 054114 (2004)

- [12] Y. Gan. Atomic and subnanometer resolution in ambient conditions by atomic force microscopy. *Surface Science Reports* **64**(3), 99–121 (2009)
- [13] F. J. Giessibl y H. Bielefeldt. Physical interpretation of frequency-modulation atomic force microscopy. *Phys. Rev. B* **61**(15), 9968–9971 (2000)
- [14] M. R. Jarvis, R. Pérez, y M. C. Payne. Can atomic force microscopy achieve atomic resolution in contact mode? *Phys. Rev. Lett.* **86**(7), 1287–1290 (2001)
- [15] D. Klinov y S. Magonov. True molecular resolution in tapping-mode atomic force microscopy with high-resolution probes. *Applied Physics Letters* **84**(14), 2697–2699 (2004)
- [16] L. Gross, F. Mohn, P. Liljeroth, J. Repp, F. J. Giessibl, y G. Meyer. Measuring the Charge State of an Adatom with Noncontact Atomic Force Microscopy. *Science* **324**(5933), 1428–1431 (2009)
- [17] K. Voitchovsky, J. J. Kuna, S. A. Contera, E. Tosatti, y F. Stellacci. Direct mapping of the solid-liquid adhesion energy with subnanometre resolution. *Nature Nanotechnology* **5**(6), 401–405 (2010)
- [18] M. Shibata, T. Uchihashi, H. Yamashita, H. Kandori, y T. Ando. Structural changes in bacteriorhodopsin in response to alternate illumination observed by high-speed atomic force microscopy. *Angewandte Chemie International Edition* **50**(19), 4410–4413 (2011)
- [19] J. Israelachvili. *Intermolecular and Surface Forces*. 2a ed^{ón}. (Elsevier Academic Press, London, 2005)
- [20] L. Zitzler, S. Herminghaus, y F. Mugele. Capillary forces in tapping mode atomic force microscopy. *Physical Review B: Condensed matter and materials physics* **66**(15), 155436 (2002)
- [21] F. F. Abraham, I. P. Batra, y S. Ciraci. Effect of tip profile on atomic-force microscope images: A model study. *Phys. Rev. Lett.* **60**(13), 1314–1317 (1988)
- [22] T. Schimmel, T. Koch, J. Kupperts, y M. Lux-Steiner. True atomic resolution under ambient conditions obtained by atomic force microscopy in the contact mode. *Applied Physics A: Materials Science ; Processing* **68**, 399–402 (1999)
- [23] F. Ohnesorge y G. Binnig. True atomic resolution by atomic force microscopy through repulsive and attractive forces. *Science* **260**(5113), 1451–1456 (1993)
- [24] D. Muller, F. Schabert, G. Buldt, y A. Engel. Imaging purple membranes in aqueous solutions at sub-nanometer resolution by atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **68**(5), 1681 – 1686 (1995)

- [25] L. Meirovitch. *Principles and Techniques of Vibrations*. 2a ed^{ón}. (Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 2000)
- [26] B. Gotsmann, C. Seidel, B. Anczykowski, y H. Fuchs. Conservative and dissipative tip-sample interaction forces probed with dynamic AFM. *Physical Review B* **60**(15), 11051 (1999)
- [27] C.-W. Yang, I.-S. Hwang, Y. F. Chen, C. S. Chang, y D. P. Tsai. Imaging of soft matter with tapping-mode atomic force microscopy and non-contact-mode atomic force microscopy. *Nanotechnology* **18**(8), 084009 (2007)
- [28] D. Martinez-Martin, E. T. Herruzo, C. Dietz, J. Gomez-Herrero, y R. Garcia. Noninvasive protein structural flexibility mapping by bimodal dynamic force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **106**(19), 198101 (2011)
- [29] F. J. Giessibl. Atomic-resolution of the silicon (111)-(7x7) surface by atomic-force microscopy. *Science* **267**(5194), 68–71 (1995)
- [30] R. Erlandsson, L. Olsson, y P. Mårtensson. Inequivalent atoms and imaging mechanisms in ac-mode atomic-force microscopy of si(111)(7x7). *Phys. Rev. B* **54**(12), R8309–R8312 (1996)
- [31] F. J. Giessibl. Atomic resolution on si(111)-(7x7) by noncontact atomic force microscopy with a force sensor based on a quartz tuning fork. *Applied Physics Letters* **76**(11), 1470 –1472 (2000)
- [32] T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige, y H. Yamada. True atomic resolution in liquid by frequency-modulation atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **87**(3), 034101 (páginas 3) (2005)
- [33] T. Fukuma, T. Ichii, K. Kobayashi, H. Yamada, y K. Matsushige. True-molecular resolution imaging by frequency modulation atomic force microscopy in various environments. *Applied Physics Letters* **86**(3), 034103 (páginas 3) (2005)
- [34] T. Fukuma, K. Kobayashi, K. Matsushige, y H. Yamada. True molecular resolution in liquid by frequency-modulation atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **86**(19), 193108–3 (2005)
- [35] B. W. Hoogenboom, H. J. Hug, Y. Pellmont, S. Martin, P. L. T. M. Frederix, D. Fotiadis, y A. Engel. Quantitative dynamic-mode scanning force microscopy in liquid. *Applied Physics Letters* **88**(19), 193109–3 (2006)
- [36] C. Stroh, H. Wang, R. Bash, B. Ashcroft, J. Nelson, H. Gruber, D. Lohr, S. M. Lindsay, y P. Hinterdorfer. Single-molecule recognition imaging microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(34), 12503–12507 (2004)

- [37] A. Alessandrini y P. Facci. AFM: a versatile tool in biophysics. *Measurement Science and Technology* **16**(6), R65–R92 (2005)
- [38] F. Ritort. Single-molecule experiments in biological physics: methods and applications. *Journal of Physics: Condensed Matter* **18**(32), R531 (2006)
- [39] M. Skobe, P. Rockwell, N. Goldstein, S. Vosseler, y N. E. Fusenig
- [40] S. E. Cross, Y.-S. Jin, J. Rao, y J. K. Gimzewski. Nanomechanical analysis of cells from cancer patients. *Nature Nanotechnology* **2**(12), 780–783 (2007)
- [41] B. Bhushan, J. N. Israelachvili, y U. Landman. Nanotribology: friction, wear and lubrication at the atomic scale. *Nature* **374**, 607–616 (1995)
- [42] B. Bhushan. Nanotribology and nanomechanics. *Wear* **259**(7-12), 1507–1531 (2005)
- [43] M. Z. Baykara, T. C. Schwendemann, E. I. Altman, y U. D. Schwarz. Three-dimensional atomic force microscopy - taking surface imaging to the next level. *Advanced Materials* **22**(26-27), 2838–2853 (2010)
- [44] S. N. Magonov y M.-H. Whangbo. *Frontmatter*, págs. I–XII (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007)
- [45] S. N. Magonov y D. H. Reneker. Characterization of polymer surfaces with atomic force microscopy. *Annual Review of Materials Science* **27**(1), 175–222 (1997)
- [46] S. Cuenot, C. Fretigny, S. Demoustier-Champagne, y B. Nysten. Surface tension effect on the mechanical properties of nanomaterials measured by atomic force microscopy. *Phys. Rev. B* **69**(16), 165410 (2004)
- [47] S. Q. Hu y A. Raman. Chaos in atomic force microscopy. *Physical Review Letters* **96**(3) (2006)
- [48] F. Jamitzky y R. W. Stark. Intermittency in amplitude modulated dynamic atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **110**(6), 618 – 621 (2010)
- [49] R. W. Stark. Bistability, higher harmonics, and chaos in afm. *Materials Today* **13**(9), 24 – 32 (2010)
- [50] O. Sahin, S. Magonov, C. Su, C. F. Quate, y O. Solgaard. An atomic force microscope tip designed to measure time-varying nanomechanical forces. *Nature Nanotechnology* **2**(8), 507–514 (2007)
- [51] J. Preiner, J. Tang, V. Pastushenko, y P. Hinterdorfer. Higher harmonic atomic force microscopy: Imaging of biological membranes in liquid. *Physical Review Letters* **99**(4), 046102–4 (2007)

- [52] D. Platz, E. A. Tholen, D. Pesen, y D. B. Haviland. Intermodulation atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **92**(15), 153106–3 (2008)
- [53] X. Xu, J. Melcher, S. Basak, R. Reifengerger, y A. Raman. Compositional contrast of biological materials in liquids using the momentary excitation of higher eigenmodes in dynamic atomic force microscopy. *Physical Review Letters* **102**(6), 060801 (2009)
- [54] T. E. Schaffer. Calculation of thermal noise in an atomic force microscope with a finite optical spot size. *Nanotechnology* **16**(6), 664–670 (2005)
- [55] M. J. Higgins, R. Proksch, J. E. Sader, M. Polcik, S. Mc Endoo, J. P. Cleveland, y S. P. Jarvis. Noninvasive determination of optical lever sensitivity in atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **77**(1), 013701 –013701–5 (2006)
- [56] P. Attard, T. Pettersson, y M. W. Rutland. Thermal calibration of photodiode sensitivity for atomic force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **77**(11), 116110 –116110–4 (2006)
- [57] L. D. Landau y E. M. Lifshitz. *Theory of Elasticity* (Pergamon, Oxford, 1970)
- [58] C. T. Gibson, G. S. Watson, y S. Myhra. Scanning force microscopy-calibrative procedures for "best practice". *Scanning* **19**(8), 564–581 (1997)
- [59] N. A. Burnham, X. Chen, C. S. Hodges, G. A. Matei, E. J. Thoreson, C. J. Roberts, M. C. Davies, y S. J. B. Tendler. Comparison of calibration methods for atomic-force microscopy cantilevers. *Nanotechnology* **14**(1), 1 (2003)
- [60] J. E. Sader, I. Larson, P. Mulvaney, y L. R. White. Method for the calibration of atomic-force microscope cantilevers. *Review of Scientific Instruments* **66**(7), 3789–3798 (1995)
- [61] J. L. Hutter y J. Bechhoefer. Calibration of atomic-force microscope tips. *Review of Scientific Instruments* **64**(7), 1868–1873 (1993)
- [62] T. Kurk, D. G. Adams, S. D. Connell, y N. H. Thomson. Three-channel false colour afm images for improved interpretation of complex surfaces: A study of filamentous cyanobacteria. *Ultramicroscopy* (2010)
- [63] R. C. Barrett y C. F. Quate. High-speed, large-scale imaging with the atomic force microscope. *Journal of Vacuum Science And Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **9**(2), 302–306 (1991)
- [64] T. Ando, N. Kodera, D. Maruyama, E. Takai, K. Saito, y A. Toda. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *Japanese Journal of Applied Physics* **41**(Part 1, No. 7B), 4851–4856 (2002)

- [65] T. Ando, N. Kodera, E. Takai, D. Maruyama, K. Saito, y A. Toda. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**(22), 12468–12472 (2001)
- [66] T. Ando, N. Kodera, Y. Naito, T. Kinoshita, K. Furuta, y Y. Y. Toyoshima. A high-speed atomic force microscope for studying biological macromolecules in action. *ChemPhysChem* **4**(11), 1196–1202 (2003)
- [67] T. Ando, T. Uchihashi, y T. Fukuma. High-speed atomic force microscopy for nano-visualization of dynamic biomolecular processes. *Progress in Surface Science* **83**(7-9), 337 – 437 (2008)
- [68] N. Kodera, D. Yamamoto, R. Ishikawa, y T. Ando. Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy. *Nature* **468**(7320), 72–76 (2010)
- [69] L. Gross, F. Mohn, N. Moll, P. Liljeroth, y G. Meyer. The Chemical Structure of a Molecule Resolved by Atomic Force Microscopy. *Science* **325**(5944), 1110–1114 (2009)
- [70] D. M. Eigler y E. K. Schweizer. Positioning single atoms with a scanning tunnelling microscope. *Nature* **344**(6266) (1990/04/05)
- [71] Y. Sugimoto, P. Pou, M. Abe, P. Jelinek, R. Perez, S. Morita, y O. Custance. Chemical identification of individual surface atoms by atomic force microscopy. *Nature* **446**(7131), 64–67 (2007)
- [72] M. Ternes, C. P. Lutz, C. F. Hirjibehedin, F. J. Giessibl, y A. J. Heinrich. The force needed to move an atom on a surface. *Science* **319**(5866), 1066–1069 (2008)
- [73] J. Mou, S. Sheng, R. Ho, y Z. Shao. Chaperonins groel and groes: views from atomic force microscopy. *Biophys J* **71**(4), 2213–21 (1996)
- [74] C. Moller, M. Allen, V. Elings, A. Engel, y D. J. Muller. Tapping-mode atomic force microscopy produces faithful high-resolution images of protein surfaces. *Biophysical Journal* **77**(2), 1150–1158 (1999)
- [75] D. J. Muller y A. Engel. Atomic force microscopy and spectroscopy of native membrane proteins. *Nature Protocols* **2**(9), 2191–2197 (2007)
- [76] A. Engel y D. J. Muller. Observing single biomolecules at work with the atomic force microscope. *Nature Structural Biology* **7**(9), 715–718 (2000)
- [77] D. J. Muller, G. BÅ $\frac{1}{4}$ ldt, y A. Engel. Force-induced conformational change of bacteriorhodopsin. *Journal of Molecular Biology* **249**(2), 239 – 243 (1995)

- [78] M. D. Dong, S. Husale, y O. Sahin. Determination of protein structural flexibility by microsecond force spectroscopy. *Nature Nanotechnology* **4**(8), 514–517 (2009)
- [79] H. Butt, P. Siedle, K. Seifert, K. Fendler, T. Seeger, E. Bamberg, A. Weisenhorn, K. Goldie, y A. Engel. Scan speed limit in atomic force microscopy. *Journal of Microscopy* **169**(1), 75–84 (1993)
- [80] G. G. Stokes. On the effect of the internal friction of fluids on the motion of pendulums. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society* **9**(II), 8–106 (1851)
- [81] L. Rosenhead. *Laminar Boundary Layers*. 1a ed^{ón}. (Dover Publications, Inc, New York, 1963)
- [82] G. N. Watson. *A Treatise on the Theory of Bessel Functions*. Cambridge Mathematical Library, 2 ed^{ón}. (Cambridge University Press, 1944)
- [83] G. Y. Chen, R. J. Warmack, A. Huang, y T. Thundat. Harmonic response of near-contact scanning force microscopy. *Journal of Applied Physics* **78**(3), 1465–1469 (1995)
- [84] J. Melcher, S. Hu, y A. Raman. Equivalent point-mass models of continuous atomic force microscope probes. *Applied Physics Letters* **91**(5), 053101–3 (2007)
- [85] G. Y. Chen, R. J. Warmack, T. Thundat, D. P. Allison, y A. Huang. Resonance response of scanning force microscopy cantilevers. *Review of Scientific Instruments* **65**(8), 2532–2537 (1994)
- [86] E. T. Herruzo y R. Garcia. Frequency response of an atomic force microscope in liquids and air: Magnetic versus acoustic excitation. *Applied Physics Letters* **91**(14), 143113–3 (2007)
- [87] J. Legleiter, M. Park, B. Cusick, y T. Kowalewski. Scanning probe acceleration microscopy (SPAM) in fluids: Mapping mechanical properties of surfaces at the nanoscale. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**(13), 4813–4818 (2006)
- [88] C. Jai, T. Cohen-Bouhacina, y A. Maali. Analytical description of the motion of an acoustic-driven atomic force microscope cantilever in liquid. *Applied Physics Letters* **90**(11), 113512 (páginas 3) (2007)
- [89] H. Hosaka, K. Itao, y S. Kuroda. Damping characteristics of beam-shaped micro-oscillators. *Sensors and Actuators A: Physical* **49**(1-2), 87–95 (1995)

- [90] S. J. O'Shea y M. E. Welland. Atomic force microscopy at solid-liquid interfaces. *Langmuir* **14**(15), 4186–4197 (1998)
- [91] J. E. Greenspon. Vibrations of cross-stiffened and sandwich plates with application to underwater sound radiators. *The Journal of the Acoustical Society of America* **33**(11), 1485–1497 (1961)
- [92] J. E. Sader. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **84**(1), 64–76 (1998)
- [93] C. P. Green y J. E. Sader. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids near a solid surface with applications to the atomic force microscope. *Journal of Applied Physics* **98**(11), 114913–114913–12 (2005)
- [94] C. P. Green y J. E. Sader. Small amplitude oscillations of a thin beam immersed in a viscous fluid near a solid surface. *Physics of Fluids* **17**(7), 073102 (páginas 12) (2005)
- [95] C. A. Van Eysden y J. E. Sader. Small amplitude oscillations of a flexible thin blade in a viscous fluid: Exact analytical solution. *Physics of Fluids* **18**(12) (2006)
- [96] C. A. Van Eysden y J. E. Sader. Frequency response of cantilever beams immersed in viscous fluids with applications to the atomic force microscope: Arbitrary mode order. *Journal of Applied Physics* **101**(4), 044908–044908–11 (2007)
- [97] D. G. Cole y R. L. Clark. Fluid-structure interaction in atomic force microscope cantilever dynamics and thermal response. *Journal of Applied Physics* **101**(3), 034303 (páginas 7) (2007)
- [98] S. Basak, A. Raman, y S. V. Garimella. Hydrodynamic loading of microcantilevers vibrating in viscous fluids. *Journal of Applied Physics* **99**(11), 114906 (páginas 10) (2006)
- [99] W. V. Houston. Methods of theoretical physics, pts. i and ii. philip m. morse and herman feshbach. mcgraw-hill, new york-london, 1953. xxx + 1978 pp. illus. 30th set, 15 each volume. *Science* **120**(3110), 212–213 (1954)
- [100] A. Maali, C. Hurth, T. Cohen-Bouhacina, G. Couturier, y J.-P. Aime. Improved acoustic excitation of atomic force microscope cantilevers in liquids. *Applied Physics Letters* **88**(16), 163504–3 (2006)
- [101] M. Nonnenmacher, J. Greschner, O. Wolter, y R. Kassing. Scanning force microscopy with micromachined silicon sensors. tomo 9, págs. 1358–1362 (AVS, 1991)

- [102] C. Rankl, V. Pastushenko, F. Kienberger, C. M. Stroh, y P. Hinterdorfer. Hydrodynamic damping of a magnetically oscillated cantilever close to a surface. *Ultramicroscopy* **100**(3-4), 301–308 (2004)
- [103] S. De Beer, D. Van Ende, y F. Mugele. Dissipation and oscillatory solvation forces in confined liquids studied by small-amplitude atomic force spectroscopy. *Nanotechnology* **21**(32) (2010)
- [104] A. Roters y D. Johannsmann. Distance-dependent noise measurements in scanning force microscopy. *Journal of Physics-Condensed Matter* **8**(41), 7561–7577 (1996)
- [105] P. K. Hansma, J. P. Cleveland, M. Radmacher, D. A. Walters, P. E. Hillner, M. Bezanilla, M. Fritz, D. Vie, H. G. Hansma, C. B. Prater, J. Massie, L. Fukunaga, J. Gurley, y V. Elings. Tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Applied Physics Letters* **64**(13), 1738–1740 (1994)
- [106] C. A. J. Putman, K. O. Van der Werf, B. G. De Grooth, N. F. Van Hulst, y J. Greve. Tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Applied Physics Letters* **64**(18), 2454–2456 (1994)
- [107] T. E. Schaffer, J. P. Cleveland, F. Ohnesorge, D. A. Walters, y P. K. Hansma. Studies of vibrating atomic force microscope cantilevers in liquid. *Journal of Applied Physics* **80**(7), 3622–3627 (1996)
- [108] W. Han, S. M. Lindsay, y T. Jing. A magnetically driven oscillating probe microscope for operation in liquids. *Applied Physics Letters* **69**(26), 4111–4113 (1996)
- [109] M. Lantz, Y. Liu, X. Cui, H. Tokumoto, y S. Lindsay. Dynamic force microscopy in fluid. *Surface and Interface Analysis* **27**(5-6), 354–360 (1999)
- [110] D. Ramos, J. Tamayo, J. Mertens, y M. Calleja. Photothermal excitation of microcantilevers in liquids. *Journal of Applied Physics* **99**(12), 124904 (páginas 8) (2006)
- [111] M. Penedo, I. Fernández-Martínez, J. L. Costa-Krämer, M. Luna, y F. Briónes. Magnetostriction-driven cantilevers for dynamic atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **95**(14), 143505 (páginas 3) (2009)
- [112] A. Buguin, O. D. Roure, y P. Silberzan. Active atomic force microscopy cantilevers for imaging in liquids. *Applied Physics Letters* **78**(19), 2982–2984 (2001)
- [113] A. O. Volkov, J. S. Burnell-Gray, y P. K. Datta. Frequency response of atomic force microscope cantilever driven by fluid. *Applied Physics Letters* **85**(22), 5397–5399 (2004)

- [114] X. Xu y A. Raman. Comparative dynamics of magnetically, acoustically, and brownian motion driven microcantilevers in liquids. *Journal of Applied Physics* **102**(3), 034303–8 (2007)
- [115] J. W. S. Rayleigh y R. B. Lindsay. *The Theory of Sound*. 2a ed^{ón}. (Dover Publications, Mineola, NY, 1976)
- [116] R. W. Stark y W. M. Heckl. Fourier transformed atomic force microscopy: tapping mode atomic force microscopy beyond the hookian approximation. *Surface Science* **457**(1-2), 219–228 (2000)
- [117] W. H. Press, B. P. Flannery, S. A. Teukolsky, y W. T. Vetterling. *Numerical Recipes in Fortran 77: The Art of Scientific Computing*. 2 ed^{ón}. (Cambridge University Press, 1992)
- [118] T. R. Rodriguez y R. Garcia. Compositional mapping of surfaces in atomic force microscopy by excitation of the second normal mode of the microcantilever. *Applied Physics Letters* **84**(3), 449–451 (2004)
- [119] N. F. Martinez, S. Patil, J. R. Lozano, y R. Garcia. Enhanced compositional sensitivity in atomic force microscopy by the excitation of the first two flexural modes. *Applied Physics Letters* **89**(15), 153115–3 (2006)
- [120] R. Proksch. Multifrequency, repulsive-mode amplitude-modulated atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **89**(11), 113121–3 (2006)
- [121] S. Patil, N. F. Martinez, J. R. Lozano, y R. Garcia. Force microscopy imaging of individual protein molecules with sub-pico newton force sensitivity. *Journal of Molecular Recognition* **20**(6), 516–523 (2007)
- [122] N. F. Martinez, J. R. Lozano, E. T. Herruzo, F. Garcia, C. Richter, T. Sulzbach, y R. Garcia. Bimodal atomic force microscopy imaging of isolated antibodies in air and liquids. *Nanotechnology* **19**, 384011 (2008)
- [123] J. W. Li, J. P. Cleveland, y R. Proksch. Bimodal magnetic force microscopy: Separation of short and long range forces. *Applied Physics Letters* **94**(16) (2009)
- [124] C. Dietz, M. Zerson, C. Riesch, A. M. Gigler, R. W. Stark, N. Rehse, y R. Magerle. Nanotomography with enhanced resolution using bimodal atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **92**(14), 143107 (2008)
- [125] Y. Naitoh, Z. Ma, Y. J. Li, M. Kageshima, y Y. Sugawara. Simultaneous observation of surface topography and elasticity at atomic scale by multifrequency frequency modulation atomic force microscopy. *Journal of Vacuum Science Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures* **28**(6), 1210–1214 (2010)

- [126] S. Kawai, T. Glatzel, S. Koch, B. Such, A. Baratoff, y E. Meyer. Systematic achievement of improved atomic-scale contrast via bimodal dynamic force microscopy. *Physical Review Letters* **103**(22) (2009)
- [127] S. Kawai, T. Glatzel, S. Koch, B. Such, A. Baratoff, y E. Meyer. Ultrasensitive detection of lateral atomic-scale interactions on graphite (0001) via bimodal dynamic force measurements. *Physical Review B* **81**(8) (2010)
- [128] C. Dietz, E. T. Herruzo, J. R. Lozano, y R. Garcia. Nanomechanical coupling enables detection and imaging of 5 nm superparamagnetic particles in liquid. *Nanotechnology* **22**(12), 125708 (2011)
- [129] R. W. Stark y W. M. Heckl. Higher harmonics imaging in tapping-mode atomic-force microscopy. *Review of Scientific Instruments* **74**(12), 5111–5114 (2003)
- [130] J. Schiener, S. Witt, M. Stark, y R. Guckenberger. Stabilized atomic force microscopy imaging in liquids using second harmonic of cantilever motion for setpoint control. *Review of Scientific Instruments* **75**(8), 2564–2568 (2004)
- [131] R. D. Turner, J. Kirkham, D. Devine, y N. H. Thomson. Second harmonic atomic force microscopy of living staphylococcus aureus bacteria. *Applied Physics Letters* **94**(4), 043901 (páginas 3) (2009)
- [132] S. Kawai, S. Kitamura, D. Kobayashi, S. Meguro, y H. Kawakatsu. An ultras-small amplitude operation of dynamic force microscopy with second flexural mode. *Applied Physics Letters* **86**(19), 193107–3 (2005)
- [133] U. Durig. Extracting interaction forces and complementary observables in dynamic probe microscopy. *Applied Physics Letters* **76**(9), 1203 –1205 (2000)
- [134] L. Gross, F. Mohn, N. Moll, G. Meyer, R. Ebel, W. M. Abdel-Mageed, y M. Jaspars. Organic structure determination using atomic-resolution scanning probe microscopy. *Nat Chem* **2**(10), 821–825 (2010)
- [135] J. Tamayo y R. Garcia. Relationship between phase shift and energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy. *Applied Physics Letters* **73**(20), 2926–2928 (1998)
- [136] J. P. Cleveland, B. Anczykowski, A. E. Schmid, y V. B. Elings. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **72**(20) (1998)
- [137] J. R. Lozano y R. Garcia. Theory of multifrequency atomic force microscopy. *Physical Review Letters* **100**(7), 076102–4 (2008)

- [138] J. R. Lozano y R. Garcia. Theory of phase spectroscopy in bimodal atomic force microscopy. *Physical Review B* **79**, 014110–4 (2009)
- [139] D. Muller y A. Engel. The height of biomolecules measured with the atomic force microscope depends on electrostatic interactions. *Biophysical Journal* **73**(3), 1633 – 1644 (1997)
- [140] A. San Paulo y R. Garcia. High-resolution imaging of antibodies by tapping-mode atomic force microscopy: Attractive and repulsive tip-sample interaction regimes. *Biophysical Journal* **78**(3), 1599–1605 (2000)
- [141] D. M. Czajkowsky y Z. Shao. The human IgM pentamer is a mushroom-shaped molecule with a flexural bias. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**(35), 14960–14965 (2009)
- [142] J. Schiener, S. Witt, M. Hayer-Hartl, y R. Guckenberger. How to orient the functional groel-sr1 mutant for atomic force microscopy investigations. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **328**(2), 477 – 483 (2005)
- [143] C. Leung y R. E. Palmer. Adsorption of a model protein, the groel chaperonin, on surfaces. *Journal of Physics: Condensed Matter* **20**(35), 353001 (2008)
- [144] D. J. Muller, M. Amrein, y A. Engel. Adsorption of biological molecules to a solid support for scanning probe microscopy. *Journal of Structural Biology* **119**(2), 172 – 188 (1997)
- [145] K. Braig, Z. Otwinowski, R. Hegde, D. C. Boisvert, A. Joachimiak, A. L. Horwich, y P. B. Sigler. The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578–586 (1994)
- [146] R. W. Stark. Dynamics of repulsive dual-frequency atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **94**(6) (2009)
- [147] P. Hohenberg y W. Kohn. Inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev.* **136**(3B), B864–B871 (1964)
- [148] W. Kohn y L. J. Sham. Self-consistent equations including exchange and correlation effects. *Phys. Rev.* **140**(4A), A1133–A1138 (1965)
- [149] H. J. Butt, B. Cappella, y M. Kappl. Force measurements with the atomic force microscope: Technique, interpretation and applications. *Surface Science Reports* **59**(1-6), 1–152 (2005)
- [150] K. L. Johnson. *Contact Mechanics*. 2a ed^{ón}. (Cambridge University Press, Cambridge, 1985)

- [151] K. L. Johnson, K. Kendall, y A. D. Roberts. Surface energy and contact of elastic solids. *Proceedings of the Royal Society of London Series a-Mathematical and Physical Sciences* **324**(1558), 301–313 (1971)
- [152] B. V. Derjaguin, V. M. Muller, y Y. P. Toporov. Effect of contact deformations on adhesion of particles. *Journal of Colloid and Interface Science* **53**(2), 314–326 (1975)
- [153] D. S. Grierson, E. E. Flater, y R. W. Carpick. Accounting for the JKR- DMT transition in adhesion and friction measurements with atomic force microscopy. *Journal of Adhesion Science and Technology* **19**(3), 291–311+
- [154] D. Maugis. Adhesion of spheres: The jkr-dmt transition using a dugdale model. *Journal of Colloid and Interface Science* **150**(1), 243 – 269 (1992)
- [155] C. Lee, X. Wei, J. W. Kysar, y J. Hone. Measurement of the elastic properties and intrinsic strength of monolayer graphene. *Science* **321**(5887), 385–388 (2008)
- [156] A. Rosa-Zeiser, E. Weilandt, S. Hild, y O. Marti. The simultaneous measurement of elastic, electrostatic and adhesive properties by scanning force microscopy: pulsed-force mode operation. *Measurement Science and Technology* **8**(11), 1333 (1997)
- [157] A. Berquand, C. Roduit, S. Kasas, A. Holloschi, L. Ponce, y M. Hafner. Atomic force microscopy imaging of living cells. *Microscopy Today* **18**(06), 8–14 (2010)
- [158] P. Maivald, H. J. Butt, S. A. C. Gould, C. B. Prater, B. Drake, J. A. Gurley, V. B. Elings, y P. K. Hansma. Using force modulation to image surface elasticities with the atomic force microscope. *Nanotechnology* **2**(2), 103 (1991)
- [159] M. Radmacher. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE* **16**(2), 47–57 (1997)
- [160] S. J. O’Shea, M. E. Welland, y J. B. Pethica. Atomic force microscopy of local compliance at solid-liquid interfaces. *Chemical Physics Letters* **223**(4), 336–340 (1994)
- [161] S. D. Solares. Single biomolecule imaging with frequency and force modulation in tapping-mode atomic force microscopy. *Journal of Physical Chemistry B* **111**(9), 2125–2129 (2007)
- [162] U. Rabe y W. Arnold. Acoustic microscopy by atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **64**(12), 1493–1495 (1994)

- [163] D. C. Hurley, K. Shen, N. M. Jennett, y J. A. Turner. Atomic force acoustic microscopy methods to determine thin-film elastic properties. *Journal of Applied Physics* **94**(4), 2347–2354 (2003)
- [164] K. Yamanaka, A. Noguchi, T. Tsuji, T. Koike, y T. Goto. Quantitative material characterization by ultrasonic afm. *Surface and Interface Analysis* **27**(5-6), 600–606 (1999)
- [165] G. Stan, S. Krylyuk, A. Davydov, M. Vaudin, L. Bendersky, y R. Cook. Contact-resonance atomic force microscopy for nanoscale elastic property measurements: Spectroscopy and imaging. *Ultramicroscopy* **109**(8), 929 – 936 (2009)
- [166] P. P. G. A. L. J. Kumar, B. The effect of set point ratio and surface young's modulus on maximum tapping forces in fluid tapping mode atomic force microscopy. *Journal of Applied Physics* **107**(4) (2010)
- [167] M. Stark, C. Moller, D. J. Muller, y R. Guckenberger. From images to interactions: High-resolution phase imaging in tapping-mode atomic force microscopy. *Biophysical Journal* **80**(6), 3009–3018 (2001)
- [168] O. Sahin. Time-varying tip-sample force measurements and steady-state dynamics in tapping-mode atomic force microscopy. *Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics)* **77**(11), 115405–6 (2008)
- [169] O. Sahin y N. Erina. High-resolution and large dynamic range nanomechanical mapping in tapping-mode atomic force microscopy. *Nanotechnology* **19**(44), 445717 (2008)
- [170] S. Husale, H. H. J. Persson, y O. Sahin. Dna nanomechanics allows direct digital detection of complementary dna and microrna targets. *Nature* **462**(7276), 1075–1078 (2009)
- [171] M. Dong y O. Sahin. A nanomechanical interface to rapid single-molecule interactions. *Nat Commun* **2**, 247 (2011)
- [172] C. Carrasco, P. Ares, P. J. de Pablo, y J. Gomez-Herrero. Cutting down the forest of peaks in acoustic dynamic atomic force microscopy in liquid. *Review of Scientific Instruments* **79**(12), 126106 –126106–2 (2008)
- [173] F. J. Giessibl. Forces and frequency shifts in atomic-resolution dynamic-force microscopy. *Physical Review B* **56**(24), 16010 (1997)
- [174] U. Durig. Relations between interaction force and frequency shift in large-amplitude dynamic force microscopy. *Applied Physics Letters* **75**(3), 433–435 (1999)

- [175] A. San Paulo y R. Garcia. Unifying theory of tapping-mode atomic-force microscopy. *Physical Review B* **66**(4), 041406 (2002)
- [176] J. P. Cleveland, B. A. Anczykowski, S. E., y E. V. B. Energy dissipation in tapping-mode atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **72**(20), 2613–2615 (1998)
- [177] J. Tamayo. Energy dissipation in tapping-mode scanning force microscopy with low quality factors. *Applied Physics Letters* **75**(22), 3569–3571 (1999)
- [178] J. E. Sader y S. P. Jarvis. Accurate formulas for interaction force and energy in frequency modulation force spectroscopy. *Applied Physics Letters* **84**(10), 1801–1803 (2004)
- [179] J. E. Sader, T. Uchihashi, M. J. Higgins, A. Farrell, Y. Nakayama, y S. P. Jarvis. Quantitative force measurements using frequency modulation atomic force microscopy - theoretical foundations. *Nanotechnology* **16**(3), S94–S101 (2005)
- [180] S. Schreiber, M. Savla, D. V. Pelekhov, D. F. Iscru, C. Selcu, P. C. Hammel, y G. Agarwal. Magnetic force microscopy of superparamagnetic nanoparticles. *Small* **4**(2), 270–278 (2008)
- [181] T. R. Albrecht, P. Grütter, D. Horne, y D. Rugar. Frequency modulation detection using high stiffness cantilevers for enhanced force microscope sensitivity. *Journal of Applied Physics* **69**(2), 668–673 (1991)
- [182] F. Giessibl. A direct method to calculate tip-sample forces from frequency shifts in frequency-modulation atomic force microscopy. *Applied Physics Letters* **78**(1), 123–125 (2001)
- [183] U. Rabe, E. Kester, y W. Arnold. Probing linear and non-linear tip-sample interaction forces by atomic force acoustic microscopy. *Surface and Interface Analysis* **27**(5-6), 386–391 (1999)
- [184] J. Tamayo y R. Garcia. Deformation, contact time, and phase contrast in tapping mode scanning force microscopy. *Langmuir* **12**(18), 4430–4435 (1996)
- [185] J. P. Spatz, S. Sheiko, M. Müller, R. G. Winkler, P. Reineker, y O. Marti. Tapping scanning force microscopy in air theory and experiment. *Langmuir* **13**(17), 4699–4703 (1997)
- [186] A. H. Nayfeh y D. T. Mook. *Nonlinear Oscillations*, págs. 617–686 (Wiley-VCH Verlag GmbH, 2007)
- [187] S. J. T. van Noort, O. H. Willemsen, K. O. van der Werf, B. G. de Grooth, y J. Greve. Mapping electrostatic forces using higher harmonics tapping mode atomic force microscopy in liquid. *Langmuir* **15**(21), 7101–7107 (1999)

- [188] M. Stark, R. W. Stark, W. M. Heckl, y R. Guckenberger. Spectroscopy of the anharmonic cantilever oscillations in tapping-mode atomic-force microscopy. *Applied Physics Letters* **77**(20), 3293–3295 (2000)
- [189] R. Hillenbrand, M. Stark, y R. Guckenberger. Higher-harmonics generation in tapping-mode atomic-force microscopy: Insights into the tip-sample interaction. *Applied Physics Letters* **76**(23), 3478–3480 (2000)
- [190] S. Crittenden, A. Raman, y R. Reifenberger. Probing attractive forces at the nanoscale using higher-harmonic dynamic force microscopy. *Physical Review B (Condensed Matter and Materials Physics)* **72**(23), 235422–13 (2005)
- [191] O. Sahin, C. F. Quate, O. Solgaard, y A. Atalar. Resonant harmonic response in tapping-mode atomic force microscopy. *Physical Review B* **69**(16), 165416 (2004)
- [192] L. Yuan y Q. Jian-Qiang. Higher harmonics generation in tapping mode atomic force microscope. *Chinese Physics Letters* **26**(10), 100703 (2009)
- [193] A. Raman, J. Melcher, y R. Tung. Cantilever dynamics in atomic force microscopy. *Nano Today* **3**(1-2), 20–27 (2008)
- [194] X. Xu, J. Melcher, y A. Raman. Accurate force spectroscopy in tapping mode atomic force microscopy in liquids. *Physical Review B* **81**(3) (2010)
- [195] N. A. Burnham, O. P. Behrend, F. Oulevey, G. Gremaud, P.-J. Gallo, D. Gourdon, E. Dupas, A. J. Kulik, H. M. Pollock, y G. A. D. Briggs. How does a tip tap? *Nanotechnology* **8**(2), 67 (1997)
- [196] X. Xu, C. Carrasco, P. J. de Pablo, J. Gomez-Herrero, y A. Raman. Unmasking imaging forces on soft biological samples in liquids when using dynamic atomic force microscopy: A case study on viral capsids. *Biophysical Journal* **95**(5), 2520 – 2528 (2008)
- [197] Y. H. Kao, J. C. Huang, y Y. S. Gou. Routes to chaos in the duffing oscillator with a single potential well. *Physics Letters A* **131**(2), 91 – 97 (1988)
- [198] A. H. Nayfeh y N. E. Sanchez. Bifurcations in a forced softening duffing oscillator. *International Journal of Non-Linear Mechanics* **24**(6), 483 – 497 (1989)
- [199] M. Franaszek y A. Nabaglo. General case of crisis-induced intermittency in the duffing equation. *Physics Letters A* **178**(1-2), 85 – 91 (1993)
- [200] T. Ozis y A. Yildirim. Determination of the frequency-amplitude relation for a duffing-harmonic oscillator by the energy balance method. *Comput. Math. Appl.* **54**, 1184–1187 (2007)

- [201] S. Ganji, D. Ganji, Z. Ganji, y S. Karimpour. Periodic solution for strongly nonlinear vibration systems by he's energy balance method. *Acta Applicandae Mathematicae* **106**, 79–92 (2009)
- [202] H. Hu. Exact solution of a quadratic nonlinear oscillator. *Journal of Sound and Vibration* **295**(1-2), 450 – 457 (2006)
- [203] J. Berg y G. A. D. Briggs. Nonlinear dynamics of intermittent-contact mode atomic force microscopy. *Phys. Rev. B* **55**(22), 14899–14908 (1997)
- [204] S. Wang y M. Wiercigroch. Forced oscillators with non-linear spring: A simple analytical approach. *Chaos, Solitons And Fractals* **41**(4), 1784 – 1790 (2009)
- [205] M. A. Savi, S. Divenyi, L. F. P. Franca, y H. I. Weber. Numerical and experimental investigations of the nonlinear dynamics and chaos in non-smooth systems. *Journal of Sound and Vibration* **301**(1-2), 59 – 73 (2007)
- [206] R. Porwal y N. S. Vyas. Damped quadratic and mixed-parity oscillator response using krylov-bogoliubov method and energy balance. *Journal of Sound and Vibration* **309**(3-5), 877 – 886 (2008)
- [207] U. Landman, W. D. Luedtke, y J. Gao. Atomic-scale issues in tribology: Interfacial junctions and nano-elastohydrodynamics. *Langmuir* **12**(19), 4514–4528 (1996)
- [208] P. Ball. Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chemical Reviews* **108**(1), 74–108 (2008)
- [209] S. J. O'Shea, M. A. Lantz, y H. Tokumoto. Damping near solid-liquid interfaces measured with atomic force microscopy. *Langmuir* **15**(4), 922–925 (1999)
- [210] R. Lim y S. J. O'Shea. Solvation forces in branched molecular liquids. *Phys. Rev. Lett.* **88**(24), 246101 (2002)
- [211] J. H. Hoh, J. P. Cleveland, C. B. Prater, J. P. Revel, y P. K. Hansma. Quantized adhesion detected with the atomic force microscope. *Journal of the American Chemical Society* **114**(12), 4917–4918 (1992)
- [212] J. P. Cleveland, T. E. Schäffer, y P. K. Hansma. Probing oscillatory hydration potentials using thermal-mechanical noise in an atomic-force microscope. *Phys. Rev. B* **52**(12), R8692–R8695 (1995)
- [213] S. Khan, G. Matei, S. Patil, y P. Hoffmann. Dynamic solidification in nano-confined water films. *Physical Review Letters* **105**(10) (2010)
- [214] Y. Zhu y S. Granick. Viscosity of interfacial water. *Phys. Rev. Lett.* **87**(9), 096104 (2001)

- [215] S. K. Steve Granick, Sung Chul Bae y C. Yu. Confined liquid controversies near closure? *Physics* **3**, 73 (2010)
- [216] L. Bureau. Nonlinear rheology of a nanoconfined simple fluid. *Phys. Rev. Lett.* **104**(21), 218302 (2010)
- [217] S. P. Jarvis, T. Uchihashi, T. Ishida, H. Tokumoto, y Y. Nakayama. Local solvation shell measurement in water using a carbon nanotube probe. *The Journal of Physical Chemistry B* **104**(26), 6091–6094 (2000)
- [218] A. Maali, T. Cohen-Bouhacina, G. Couturier, y J.-P. Aimé. Oscillatory dissipation of a simple confined liquid. *Phys. Rev. Lett.* **96**(8), 086105 (2006)
- [219] T. Fukuma, M. J. Higgins, y S. P. Jarvis. Direct imaging of individual intrinsic hydration layers on lipid bilayers at angstrom resolution. *Biophysical Journal* **92**(10), 3603 – 3609 (2007)
- [220] T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, y H. Asakawa. Atomic-scale distribution of water molecules at the mica-water interface visualized by three-dimensional scanning force microscopy. *Phys. Rev. Lett.* **104**(1), 016101 (2010)
- [221] K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai, y H. Yamada. Visualizing water molecule distribution by atomic force microscopy. *The Journal of Chemical Physics* **132**(19), 194705 (páginas 5) (2010)
- [222] H. Holscher, S. M. Langkat, A. Schwarz, y R. Wiesendanger. Measurement of three-dimensional force fields with atomic resolution using dynamic force spectroscopy. *Applied Physics Letters* **81**(23), 4428 –4430 (2002)
- [223] B. J. Albers, T. C. Schwendemann, M. Z. Baykara, N. Pilet, M. Liebmann, E. I. Altman, y U. D. Schwarz. Three-dimensional imaging of short-range chemical forces with picometre resolution. *Nature Nanotechnology* **4**(5), 307–310 (2009)
- [224] H. Asakawa y T. Fukuma. Spurious-free cantilever excitation in liquid by piezoactuator with flexure drive mechanism. *Review of Scientific Instruments* **80**(10), 103703 (páginas 3) (2009)
- [225] L. P. K. J. Raviv, U. Fluidity of water confined to subnanometre films. *Nature* **413**(6851), 51–54 (2001)
- [226] M. Odelius, M. Bernasconi, y M. Parrinello. Two dimensional ice adsorbed on mica surface. *Phys. Rev. Lett.* **78**(14), 2855–2858 (1997)
- [227] P. B. Miranda, L. Xu, Y. R. Shen, y M. Salmeron. Icelike water monolayer adsorbed on mica at room temperature. *Phys. Rev. Lett.* **81**(26), 5876–5879 (1998)

-
- [228] M. Antognozzi, A. D. L. Humphris, y M. J. Miles. Observation of molecular layering in a confined water film and study of the layers viscoelastic properties. *Applied Physics Letters* **78**(3), 300 –302 (2001)
- [229] L. Cheng, P. Fenter, K. L. Nagy, M. L. Schlegel, y N. C. Sturchio. Molecular-scale density oscillations in water adjacent to a mica surface. *Phys. Rev. Lett.* **87**(15), 156103 (2001)
- [230] A. J. Katan, M. H. van Es, y T. H. Oosterkamp. Quantitative force versus distance measurements in amplitude modulation afm: a novel force inversion technique. *Nanotechnology* **20**(16), 165703 (2009)

